

Aus dem Pharmakologischen Institut
des Bereichs Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. E. Habermann

**Neuropharmakokinetik von ^{125}J -Tetanustoxin
nach intramuskulärer, intrakutaner
und subseröser Injektion**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereichs Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

vorgelegt von
Bernd Hensel
aus Cadenberge

Gießen 1972

Aus dem Pharmakologischen Institut
des Bereichs Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. E. Habermann

**Neuropharmakokinetik von ^{125}J -Tetanustoxin
nach intramuskulärer, intrakutaner
und subseröser Injektion**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereichs Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

vorgelegt von
Bernd Hensel
aus Cadenberge

Gießen 1972

Von dem Pharmakologen Dr. H. H. Staudinger
des Reiches Gesundheitsamt
der Justiz, Landes-Universität Gießen
Dekan: Prof. Dr. H. H. Staudinger

Neuropharmacologische und
nach pharmakologischer Untersuchung
und pharmakologischer Infektion

INANGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
des Reiches Gesundheitsamt
der Justiz, Landes-Universität zu Gießen



Dekan: Prof. Dr. Hj. Staudinger

Referent: Prof. Dr. H. H. Wellhöner

Coreferent: Prof. Dr. R. Voss

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1. Der Nachweis einer direkten spinalen Wirkung von Tetanustoxin
- 1.2. Hypothesen über die Bedeutung der neuralen Toxinascension für die spinale Toxinwirkung
- 1.3. Die Methoden zum Nachweis von Tetanustoxin und ihre Mängel
- 1.4. Fragestellung für die eigenen Untersuchungen

2. Material, Methoden, Statistik

- 2.1. ^{125}J -Tetanustoxin: Charakterisierung, Dosierung
- 2.2. Tiermaterial
- 2.3. Narkose
- 2.4. Operatives Vorgehen bei Versuchen mit intramuskulärer Injektion
- 2.5. Elektrische Reizung und Ableitung
- 2.6. Operatives Vorgehen bei Versuchen mit intracutaner Injektion
- 2.7. Operatives Vorgehen bei Versuchen mit subseröser Injektion an der kleinen Kurvatur des Magens
- 2.8. Sektion und Gewinnung der Gewebeproben
- 2.9. Bestimmung der Radioaktivität in den Gewebeproben, Bestimmung des Fehlers der Einzelmessung, paarweise Vergleiche und Signifikanztest

3. Ergebnisse

- 3.1. Intramuskuläre Injektionen von ^{125}J -Tetanustoxin
 - 3.1.1. Radioaktivität in den Mm. gastrocnemici
 - 3.1.2. Radioaktivität in den Nn. ischiadici
 - 3.1.3. Radioaktivität von Geweben aus der Nachbarschaft des M. gastrocnemius und des N. ischiadicus
 - 3.1.4. Radioaktivität in den Ventral- und Dorsalwurzeln
 - 3.1.5. Radioaktivität im Rückenmark

3.2. Kontrollversuche

3.2.1. Blockade der Radioaktivitätszunahme im Rückenmark durch Tetanusantitoxin

3.2.2. Injektion von Na^{125}J in den M. gastrocnemius

3.2.3. Injektion von ^{125}J -Tetanusantitoxin in den M. gastrocnemius

3.3. Der Einfluß neuromuskulärer Aktivität auf die Aszension von ^{125}J -Tetanustoxin

3.3.1. Vorbemerkung zum Versuchsplan

3.3.2. Direkte Reizung des M. gastrocnemius

3.3.3. Orthodrome Reizung des N. ischiadicus

3.3.4. Reizung der Flexoren und Adduktoren des Oberschenkels

3.3.5. Reflektorischer Antrieb der Efferenzen zum M. gastrocnemius

3.3.6. Antidrome Reizung der Dorsalwurzeln

3.4. Versuche mit intracutaner Injektion

3.4.1. Einseitige Injektion

3.4.2. Kontrollversuch

3.4.3. Doppelseitige Injektion und einseitige Ligatur

3.5. Untersuchungen mit subseröser Injektion von ^{125}J -Tetanustoxin

3.5.1. Radioaktivität in den Vagusnerven

3.5.2. Radioaktivität in der Medulla oblongata

3.5.3. Rückenmark

3.5.4. Radioaktivität in anderen Geweben

4. Diskussion

4.1. Die Aszension von Tetanustoxin im Nerven und in den Rückenmarkswurzeln

4.2. Die lokale Anreicherung von Tetanustoxin im Rückenmark

4.3. Tetanus-Antitoxin

4.4. Aktivität im neuromuskulären System

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Der Nachweis einer direkten spinalen Wirkung von Tetanustoxin

Brooks et al. (1957) wiesen nach, daß bei spinalisierten Katzen 33 Stunden nach Injektion von Tetanustoxin in den N. ischiadicus die reziproke, **die** autogene und die recurrente Hemmung auf der zur Injektionsstelle ipsilateralen Seite erheblich stärker reduziert sind als auf der kontralateralen Kontrollseite, die monosynaptischen Reflexe sich hingegen nicht asymmetrisch ändern. Erst seither ist unbestritten, daß eine asymmetrische Funktionsänderung spinaler Neurone durch einseitige Injektion von Tetanustoxin zu erzeugen ist, und daß diese Funktionsänderung nicht allein sekundäre Folge eines veränderten Afferenzeinstromes sein kann.

Die Versuche sagen nichts darüber aus, ob eine neurale Toxinascension auch dann stattfindet, wenn Tetanustoxin nicht intraneural injiziert wird. Diese Frage hat sowohl für die Pathogenese des lokalen als auch des generalisierten Tetanus Bedeutung und ist seit der Jahrhundertwende Gegenstand zum Teil heftig ausgetragener Kontroversen.

1.2. Hypothesen über die Bedeutung der neuralen Toxinascension für die spinale Toxinwirkung

Tetanustoxin hat ein Molekulargewicht von etwa 140 000 - 150 000. (Mangalo et al. 1968, Murphy et al. 1968)

Für Proteine dieser Größe ist unwahrscheinlich, daß sie die Blut- Hirn- Schranke durch passive Diffusion überwinden (Brightman et al. 1970).

Bereits vor der Jahrhundertwende haben Bruschettini (1892) und Brunner (1892) auf die Möglichkeit einer neuralen Toxinascension hingewiesen. Marie und Morax (1902) engten diese Hypothese ein, indem sie für die Ascension nur den intraaxonalen Raum zuließen. Eine nochmalige Einengung bedeutete das Postulat von Meyer und Ransom (1903), wonach nur motorische Axone für die Toxinwanderung in Frage kommen. Die alternative Möglichkeit eines extraaxonalen Toxintransportes diskutierte erstmalig

Gumprecht (1895 a,b). Dieser Ansicht schloß sich Meyer (Meyer und Gottlieb 1936) später an.

Besonders die erheblich verengte Hypothese von Meyer und Ransom hat Widerspruch hervorgerufen. Die schärfste antithetische Formulierung gaben Abel und Mitarbeiter (1935) in der Überschrift zu einer Veröffentlichung: "The toxin of the bacillus tetani is not transported to the central nervous system by any component of the peripheral nerve trunks."

Thesen und Antithesen leben im wesentlichen von einem methodischen Negativum: Bis vor kurzem war der quantitative Nachweis von Tetanustoxin im Gewebe nicht mit hinreichender Genauigkeit möglich.

1.3. Die Methoden zum Nachweis von Tetanustoxin und ihre Mängel

a) Der Nachweis über die Wirkung direkt am Versuchstier ist schlecht quantifizierbar und präjudiziert überdies in vielen Fällen den Wirkungsmechanismus.

b) Der Nachweis durch eine Gewebsextraktion bei großen Versuchstieren und anschließende Toxizitätsprüfung der Extrakte an Mäusen erfordert die Gabe extrem hoher Dosen. Er ist unsicher, da die Extraktion verschieden vollständig gelingt. Dies gilt im übertragenen Sinn auch für die Überimpfung ganzer Gewebsstücke, da die Fixation des Toxins in ihnen unterschiedlich stark ist. Diese Schwierigkeiten haben Doerr et al. (1936 a) ausführlich dargestellt. Dementsprechend führten spätere Versuche von Kryzhanovskii et al. (1961) nur zu semiquantitativen Ergebnissen. Die Autoren überimpften Stücke der peripheren Nerven, Ventral- und Dorsalwurzeln sowie Spinalganglien vergifteter Spendertiere auf hochempfindliche Empfängertiere (Mäuse) und beurteilten den Toxingehalt nach dem Ausmaß der Vergiftungserscheinungen (subjektiv beurteilt und klassiert). Der Toxingehalt im Rückenmark läßt sich mit dieser Methode nicht mehr feststellen (Übersicht hierzu bei Zacks und Sheff 1970).

c) Der Nachweis durch Immunfluoreszenzmikroskopie (Zacks und Sheff, 1965) und der Nachweis immunreaktiven Tetanustoxins

durch Kopplung mit (histochemisch nachweisbarer) Meerettich-Peroxydase über einen Antikörper (Zacks und Sheff, 1968) gelingt erst nach Injektion mehrfach tödlicher Dosen von Tetanustoxin. Beide Verfahren haben großen Wert für die histologische Lokalisation von Tetanustoxin. Quantifizierbar sind sie bislang nicht.

d) Der quantitative Toxinnachweis im Gewebe wurde erst möglich, nachdem die Markierung des Proteins mit radioaktiven Isotopen gelang. Erste Versuche unternahm Fedinec (1967) mit ^3H -Tetanustoxin, das nach Wilzbach tritiiert war. Der Kongreßmitteilung (aus der die Qualität des Toxins nicht ersichtlich ist) folgte keine detaillierte Veröffentlichung. Es ist bekannt, daß ^3H -Atome, die nach Wilzbach in ein Proteinmolekül eingeführt werden, leicht austauschen. - Kirilenko et al. (1965) veröffentlichten Untersuchungen mit ^{131}J -Tetanustoxin. Ausgangsmaterial und Jodierungsgrad waren jedoch so beschaffen, daß die Autoren auswertbare Ergebnisse an Mäusen erst nach Injektion der 1500-fach tödlichen Dosis erhielten. - Durch Einsatz eines sehr reinen Ausgangsmaterials und durch entscheidende Verbesserungen bei dessen Jodierung gelang Habermann (1970, 1972) die Darstellung eines ^{125}J -Tetanustoxins hoher spezifischer Aktivität. Eine Überschlagsrechnung und Vorversuche ließen erkennen, daß nach Injektion der einfachen tödlichen Dosis bei der Katze die Meßgenauigkeit für pharmakokinetische und speziell neuropharmakokinetische Untersuchungen ausreichen sollte. Daraufhin wurden die Untersuchungen begonnen und Ergebnisse vorläufig mitgeteilt. Ein Teil der Ergebnisse wird in dieser Dissertation ausführlicher dargestellt.

1.4. Fragestellung für die eigenen Untersuchungen

Die vorliegende Arbeit enthält Untersuchungen mit ^{125}J -Tetanustoxin zu folgenden Fragen:

- 1) Läßt sich nach intramuskulärer Injektion von ^{125}J -Tetanustoxin eine erhöhte Radioaktivität nachweisen
 - a) im versorgenden peripheren gemischten Nerven
 - b) in den korrespondierenden Ventralwurzeln

- c) in den korrespondierenden Dorsalwurzeln
 - d) in den korrespondierenden Rückenmarkssegmenten?
- 2) Falls sich zu 1) positive Befunde ergeben:
Welchen Einfluß hat Tetanus-Antitoxin auf die Veränderung der Radioaktivität im Nerven, in den Wurzeln und im Rückenmark?
- 3) Nach Ponomarew (1928) treten die Symptome des lokalen Tetanus nach muskulärer Arbeit beschleunigt auf. Läßt sich in entsprechender Versuchsanordnung auch eine vermehrte Zunahme der Radioaktivität im Rückenmark nach intramuskulärer Injektion von ^{125}J -Tetanustoxin nachweisen?
- 4) Baylis et al. (1952), Wright (1953) haben die Befunde von Ponomarew (1928) durch Annahme einer Muskelpumpe zu erklären versucht. Nach ihrer Ansicht erhöht sich während der Kontraktion eines Muskels der Druck auf die in dem Muskel befindlichen neuralen Elemente so stark, daß Tetanustoxin in zentripetaler Richtung gepreßt oder massiert wird. Ist diese Hypothese einer Muskelpumpe haltbar?
- 5) Ergeben sich Hinweise auf eine Ausbreitung von Tetanustoxin über den Liquor nach intramuskulärer Toxininjektion?
- 6) Läßt sich nach intrakutaner Injektion von ^{125}J -Tetanustoxin eine erhöhte Radioaktivität nachweisen
- a) in den zugehörigen Nerven
 - b) in den korrespondierenden Rückenmarkssegmenten?
- 7) Ambache und Lippold (1949) haben nach subseröser Injektion von Tetanustoxin (Innervationsgebiet des N. vagus an der kleinen Kurvatur des Magens) Bradykardie beobachtet und schließen auf eine Toxinascension im N. vagus. Läßt sich dies durch Messung der Radioaktivität nach Injektion von ^{125}J -Tetanustoxin bestätigen?

2. Material, Methoden, Statistik

2.1. Tetanustoxin

Tetanustoxin wurde aus dem Institut Pasteur von Bizzini und Turpin zur Verfügung gestellt (Bizzini et al., 1969) und von Habermann und Räker mit ^{125}J markiert. Die Jodierung verschiedener Chargen führte zu Produkten, die sich in ihrer Toxizität und Radioaktivität geringfügig, in ihrer Immunreaktivität so gut wie gar nicht unterschieden (Habermann 1970, 1972). Eine repräsentative Charge hatte unmittelbar nach der Markierung folgende Werte (bestimmt von Habermann und Mitarb.): 875×10^3 gezählte Impulse (counts)/min μg Toxin entsprechend 1093 mCi/mg Toxin bei einer Fenstereinstellung von 48 - 100 KeV; minimale letale Dosis (MLD) = $7,5 \cdot 10^{-9} \text{ g Toxin/kg Maus}$ (zum Vergleich MLD des Ausgangsmaterials $2,5 - 3,3 \cdot 10^{-9} \text{ g Toxin/kg Maus}$). Immunreaktivität: das mit Trichloressigsäure fällbare Material wurde zu 90% an Festphasen-Antikörper gebunden. Diese Angaben wurden wie folgt auf die Katze für die eigenen Versuche umgerechnet: Nach Fildes et al. (1929) verhalten sich die minimal tödlichen Dosen für Katze und Maus wie 600 : 1, d.h. 1 MLD/kg Katze = 600 MLD/kg Maus. Es gilt also die Näherung: $1/600 \text{ MLD/kg Katze} = 1 \text{ MLD/kg Maus} = 7,5 \cdot 10^{-9} \text{ g Toxin pro kg Maus entspr. } 6540 \text{ cpm (counts per minute)/kg Maus}$. Hieraus: 1 MLD/kg Katze = $4,5 \mu\text{g } ^{125}\text{J-Tetanustoxin}$, entsprechend $3,8 \cdot 10^6 \text{ cpm}$. Nach Ablauf einer Halbwertszeit (60 Tage für ^{125}J) entspräche 1 MLD/kg Katze noch $1,9 \cdot 10^6 \text{ cpm}$. Innerhalb dieser Zeit wurde die Charge in jedem Fall verbraucht. Bei allen Tieren überstieg die injizierte Gesamtdosis niemals die für 1 MLD berechnete Menge von $4,5 \mu\text{g } ^{125}\text{J-Tetanustoxin/kg Katze}$. Minimal wurden $1 \mu\text{g/kg}$ injiziert. Keine der untersuchten Katzen starb im Versuchszeitraum, obwohl sich die Tiere zum Teil nach einem umfangreichen Eingriff (siehe operatives Vorgehen) bis zu 40 Stunden in Narkose befanden.

2.2. Versuchstiere

Versuchstiere waren 57 Katzen beiderlei Geschlechts im Gewicht von 1,8 - 2,5 kg. Von den 57 Tieren entfielen 33 auf die Ver-

suche mit intramuskulärer, 16 auf die Versuche mit intrakutaner und 8 auf die Versuche mit subseröser Toxininjektion. Die Tiere wurden routinemäßig gegen die infektiöse Enteritis (Panleukopenie) mit Felidovac^R (Behring) geimpft. Gelegentlich auftretende Infekte des Respirationstraktes wurden mit Chloramphenicol (200mg i.m für 3-4 Tage) behandelt.

2.3. Narkose, Überwachung und Substitution:

Bei allen Tieren der Serien mit intrakutaner, subseröser und bei 15 Tieren mit intramuskulärer Injektion wurde nach Prämedikation mit Atropin (0,5 mg pro Katze) eine Athernarkose nur während der Operation durchgeführt, aus der die Katzen spätestens 10 Minuten nach Absetzen des Äthers erwachten. 16 Tiere wurden mit Chloralose-Urethan während der ganzen Versuchsdauer narkotisiert (initial 65 mg -Chloralose pro kg Körpergewicht gelöst in 1 ml 20%iger Urethanlösung intraperitoneal, später bei Bedarf Nachinjektion von einem Viertel dieser Mischung intravenös).

8 der dauernd narkotisierten Katzen wurden zusätzlich mit Alcuronium (Alloferin^R) oder Gallamin (Flaxedil^R) relaxiert. Die Vollständigkeit der Relaxation wurde jeweils elektromyographisch überprüft und die Dosierung der Muskelrelaxantien danach eingerichtet. Im Mittel betrug sie für Alcuronium 0,2 mg/kg im Abstand von 20 Minuten. In Abständen von 30 Minuten bis 4 Stunden wurden bei den dauernarkotisierten Katzen pH, pCO₂ und der Basenüberschuß mit dem Mikro-Astrup-System bestimmt; Richtwerte waren hierbei die von Herbert und Mitchell (1971) für die Katze veröffentlichten Größen.

Alle zunächst spontan atmenden Katzen, die während der Dauernarkose Zeichen respiratorischer Acidose erkennen ließen, wurden wie die relaxierten Tiere künstlich beatmet (Positivdruckbeatmung, 18/min., Inspirationszeit: Expirationszeit = 4:5, Wahl des Hubvolumens je nach Ausfall der Blutgasanalysen).

Bei Zeichen metabolischer Acidose wurde 8,4%ige Natriumbicarbonatlösung intravenös injiziert. (Berechnung der jeweils zu injizierenden Menge nach folgender Formel: Menge HCO₃ (mVal) = KG x BE/3, wobei KG = Körpergewicht, BE = Basenüberschuß bzw. Basendefizit).

Die Körpertemperatur wurde rektal gemessen und durch An- bzw. Abschalten eines Heizkissens und einer Infrarotlampe zwischen 37°C und 39°C gehalten.

Im Abstand von 30 Minuten wurde routinemäßig Blutdruck, Pulsfrequenz und Atemfrequenz registriert, die Narkose- und Relaxationstiefe geprüft und Dextran (Rheomacrodex 10%ig, 0,5-0,75 ml/kg) injiziert.

Die vorstehend dargestellten Überwachungs- und Pflegemaßnahmen waren in allen Fällen ausreichend, um bis zum Versuchsende (nach 30-40 Stunden) eine Acidose zu verhüten und arterielle Mitteldruckwerte von wenigstens 100 mm Hg aufrecht zu erhalten.

2.4. Operatives Vorgehen bei intramuskulärer Injektion

Alle Toxininjektionen erfolgten in Muskeln der Hinterextremität. Tiere, die sich nach der Injektion frei bewegen sollten, erhielten die Injektion dennoch in Äthernarkose (Stadium I). Dies hatte den Vorteil, daß ein Verspritzen radioaktiven Materials durch Gegenwehr der Katzen vermieden wurde und außerdem nach Hautschnitt eine gezielte Injektion des Toxins (z.B. in den medialen oder lateralen Bauch des M. gastrocnemius) möglich war.

Bei einem Teil der Versuche in Dauernarkose wurde eine Laminektomie ausgeführt, um die lumbalen Dorsalwurzeln oder Ventralwurzeln nach Durchtrennung auf Elektroden zu legen. Das operative Vorgehen hierbei erfolgte nach klassischer neurophysiologischer Technik: In Rückenlage der Katze katheterisiert man zunächst eine V. jugularis externa und eine A. carotis interna (zur Injektion bzw. zur blutigen Messung des arteriellen Druckes) und bindet nach Tracheotomie eine Trachealkanüle (zum Anschluß der Atempumpe) ein. Danach bringt man das Tier in Bauchlage, stellt den Processus spinosus des ersten oder zweiten Lendenwirbels dar und führt in die Gehörgänge (unblutig) und in die Trochanteren (blutig) Stifte ein. An den vier Stiften und dem Processus spinosus L 1 wird die Katze anschließend in einem Gestell mit dem Rücken nach oben so suspendiert, daß Brust und Bauch den Tisch nicht mehr berühren. Anschließend führt man einen Hautschnitt über die Dornfortsätze L 1 - L 2, sucht nach Eröffnung der Fascie zu beiden Seiten die erste lateral der

Dornfortsätze liegende Muskelnische auf und eröffnet sie. Unter sorgfältiger Blutstillung wird die mediale, an die Dornfortsätze grenzende und dort teilweise inserierende Muskulatur abgeräumt. Anschließend entfernt man den Dornfortsatz von S 1, faßt den Dornfortsatz von L 7 mit einer geeigneten Zange und beginnt die Abtragung des Knochens zwischen L 7 und S 1 mit einer Hohlmeißelzange nach Luer. Die Laminektomie wird zwischen L 4 und S 2 vervollständigt. Hierbei muß man vermeiden, die Dura aufzureißen oder durch zu weites Abtragen des Knochens an den Querfortsätzen Blutungen auszulösen. In diesem Stadium der Operation wurde bei 10 Tieren die Dura mit einer Kanüle unter genauer Beobachtung der Spitze durchstoßen und ohne Verletzung des Rückenmarks Liquor entnommen. Nach Beendigung der Laminektomie wird die Dura durch einen medianen Sagittalschnitt gespalten, die Ränder nach lateral geschlagen und mit Nadeln an der Muskulatur fixiert. Danach zieht man beiderseits die Hautränder an Fäden (die man am Versuchsgestell befestigt) hoch, so daß eine "Wanne" entsteht. Die Wanne füllt man mit warmen Paraffinöl und verhindert so das Austrocknen des nervösen Substrates. Unter Beobachtung durch ein Operationsmikroskop werden anschließend die Dorsal- und Ventralwurzeln voneinander separiert und entsprechend dem jeweiligen Versuchsziel unterbunden und durchtrennt.

2.5. Elektrische Reizung und Ableitung in den Versuchen mit intramuskulärer Toxininjektion

Alle Nerven- und Muskelgewebe wurden aus einer Reizisoliereinheit niederohmiger Ausgangsimpedanz über Platinelektroden mit Gruppen von Rechteckimpulsen gereizt, wobei die Breite des einzelnen Rechteckimpulses mit 0,5 msec für alle Versuche konstant war. Die anderen Reizparameter waren je nach Versuchsziel variabel. Für ihre Wahl wurde beachtet: Ein Impulsgruppenabstand von wenigstens 4 sec wird routinemäßig bei Aktivierung synaptischer Vorgänge bevorzugt, da in dieser Zeit Inhibitionsvorgänge genügend abklingen. Der Impulsabstand von 2,5 msec bei orthodromer Dorsalwurzelreizung hat sich zur Förderung des monosynaptischen Reflexes durch Summation bewährt (Eccles, J.C., R.Schmidt and W.D. Willis, 1962). Der Impulsabstand von 2,5 msec erwies

sich bei Reizung der Ventralwurzeln als optimal, um im Elektromyogramm Summation als Zeichen unzureichender Relaxierung zu erkennen (Abb. 1). Der Impulsabstand bei antidromer Reizung der Dorsalwurzeln wurde entsprechend gewählt, da es auch hier darauf ankam, eine etwa elektronisch überspringende Erregung motorischer Efferenzen elektromyographisch zu erkennen. Der Gruppenabstand bei antidromer Dorsalwurzelreizung kann kurz sein, da polysynaptische Vorgänge mit Sicherheit nicht zu erwarten sind.

Das Elektromyogramm wurde bipolar mit Silberdrahtelektroden aus dem M. gastrocnemius abgeleitet, wenn dies zu Kontrollzwecken erforderlich war. Kontrolliert wurde bei Versuchen mit (orthodromer) Erregung der neuromuskulären Synapsen die Vollständigkeit der muskulären Relaxation und bei Versuchen mit antidromer Stimulation der Dorsalwurzeln die Abwesenheit der skeletomotorischen Aktivität (denkbar etwa durch elektrotonisch überspringende Erregung motorischer Efferenzen). Nach Mitteilung von Laporte⁺ ist die elektromyographische Registrierung der muskulären Aktivität den empfindlichsten Methoden der mechanischen Spannungsmessung noch immer überlegen.

Bei einigen Versuchen mit antidromer Dorsalwurzelreizung wurde orientierend untersucht, ob sich die Durchblutung des M. gastrocnemius ändert. Dies geschah unter Anleitung und Hilfe von Herrn Prof. Brück nach der von Golenhofen et al. (1963) beschriebenen Methode mit einfachen, durch den M. gastrocnemius gezogenen Thermoelementen und einem Fluvograph^R-Registriergerät.

2.6. Operatives Vorgehen bei intrakutaner Toxininjektion:

Zur Unterbrechung der Lymphgefäßverbindungen zwischen der linken und der rechten Seite wurde die Haut durch 15 cm lange mediane Sagittalschnitte ventral vom Manubrium sterni und dorsal vom Dornfortsatz des siebten Halswirbels abwärts durchtrennt und durch Knopfnähte wieder geschlossen. Danach wurde ein Rippenbogenrandschnitt angelegt, die Haut vorsichtig mobilisiert und die kutane Insertion des Hautastes eines N. intercostalis lateralis (Nomenklatur nach Sears 1964) lokalisiert.

Dieses Insertionsgebiet ließ sich auf der Haarseite der Haut mit einem Fettstift markieren. Nach Wundverschluß mit Knopf-

⁺) Laporte, Y.: Persönliche Mitteilung an H. Wellhöner (1971)

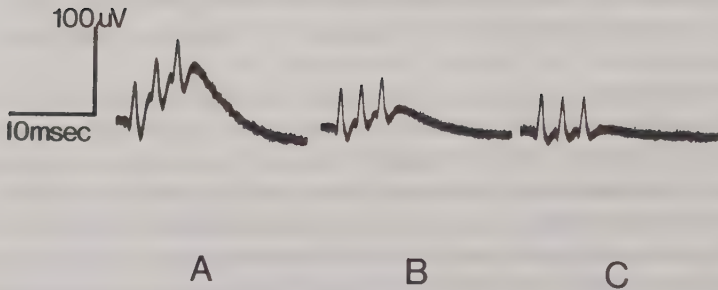


Abb. 1: Elektromyographische Kontrolle der Vollständigkeit der Relaxation (Katze No.56). Erdelektrode in der Haut über der Tibia, bipolare Ableitung aus dem M. gastrocnemius medialis, eine Ableitelektrode in der Nähe des versorgenden Nerven. Reizung der Ventralwurzeln L 6/L 7 mit Impulsgruppen (drei Impulse pro Gruppe, Impulsabstand 2,5 msec). In jeder Abbildung sind 10 Reizantworten superponiert. Filter bei 10 Hz und 10 kHz. A) keine Relaxation B) unvollständige Relaxation nach 6 mg/kg Gallamin iv. C) vollständige Relaxation nach dreimaliger Nachinjektion von 6 mg Gallamin im Abstand von 10 min.

nähten erfolgte die Injektion von ^{125}J -Tetanustoxin streng intrakutan in das markierte Gebiet.

2.7. Operatives Vorgehen bei subseröser Injektion an der kleinen Kurvatur des Magens:

Nach Laparotomie durch medianen Sagittalschnitt wurde der Magen teilweise vorgelagert und das Insertionsgebiet des linken N. vagus (auf der Magenvorderwand cardianahe zur kleinen Kurvatur gelegen) aufgesucht. An dieser Stelle wurde Tetanustoxin streng subserös injiziert, danach die Laparotomiewunde schichtweise verschlossen.

2.8. Sektion und Gewinnung der Gewebeproben

Zur Sektion wurden alle Katzen in Nembutal^R-Narkose (30 mg/kg i.p.) durch Entbluten aus beiden Aa. carotides getötet. Proben zur Messung der Radioaktivität in Blut und Plasma wurden aufgefangen. Nach Laminektomie und Spaltung der Dura markiert man zweckmäßigerweise zuerst die Wurzeln der Segmente Th 2 und L 7 durch Ligaturen, um sich später die Identifikation der Segmente zu erleichtern, und entnimmt das Rückenmark erst danach, wobei man die Dorsal- und Ventralwurzeln der Lumbal- und Sakralsegmente möglichst rückenmarksfern abtrennt. Das so entnommene Rückenmark wurde auf eine Präparierplatte gelegt und zunächst die Dorsal- und Ventralwurzeln im Lumbal- und Sakralbereich abgetrennt. Diese Wurzelabschnitte bildeten weitere Meßproben. Danach wurde die Medulla spinalis mit Rasiermesserklängen jeweils caudal vom Eintritt eines Ventralwurzel-paares durch Horizontalschnitte durchtrennt und die für die Fragestellung des jeweiligen Versuchs relevanten Segmente nochmals durch Längsteilung in der Sagittalebene in eine linke und eine rechte Hälfte zerlegt. Bei den Versuchen mit Injektion von Tetanustoxin in die Magenwand wurde im Hinblick auf die Lage der Vaguskerne auch noch die Pons segmentiert und längsgeteilt. Weitere Meßproben wurden aus supraspinalen Strukturen entnommen. Danach erfolgte die Präparation der für den Versuch relevanten peripheren Nerven. Dies waren entweder beide Nn. ischiadici mit den Nn. pe-

ronei und den Nn. tibiales, oder beide Nn. vagi. Bei der Präparation ist besonders bei den dünnen Anteilen der Nerven das Austrocknen zu vermeiden. Durch Aufstellung und Einhaltung eines daraufhin ausgerichteten Sektionsplanes erreicht man, daß die Zeit zwischen Exposition eines Nervenstückchens und seiner Verbringung in ein verschließbares Gefäß (Eppendorfgefäß) möglichst kurz ist. Alle Nerven wurden auf ein Plastiklineal gelegt und mit einer Rasierklinge in Stücke von 1 cm oder 2 cm Länge geteilt. Die Stücke bildeten weitere Meßproben. Die Sektion wurde mit der Entnahme von Gewebe aus Muskulatur und den inneren Organen abgeschlossen. Alle Proben wurden sofort nach ihrer Gewinnung in verschließbare gewogene Eppendorfgefäße verbracht und ihr Feuchtgewicht bestimmt.

Die Eppendorfgefäße wurden danach bei 16 000 U/min 30 sek lang zentrifugiert, anschließend in Reagenzgläser eingeführt und die Reagenzgläser zur Zählung in das Meßgerät eingesetzt.

2.9. Bestimmung der Radioaktivität in den Gewebeproben, Bestimmung des Fehlers der Einzelmessung, paarweise Vergleiche und Signifikanzteste.

Die Messung der -Aktivität erfolgte in einem Gerät vom Typ Autogamma der Fa. Packard. Da die Feldcharakteristik der Geräte produktionsbedingten Streuungen unterliegt, muß man die optimale Fenstereinstellung durch Probieren feststellen. Hierzu stellt man die Fenster zunächst auf einen dem Energieniveau der ^{125}J -Strahlung vermutlich entsprechenden Wert ein, etwa auf 40 und 200 KeV. Für die pro Probe maximal praktikable Meßzeit (in den vorliegenden Versuchen $t = 50$ min) bestimmt man (nach Säuberung des Bohrloches) den Nullzählwert N_0 . Danach stellt man sich eine ^{125}J -Probe geringer Aktivität her, setzt sie in das Bohrloch und liest nach $t = 50$ Minuten den Probenzählwert N_1 ab. Die Verwendung gleicher Meßzeiten ist zweckmäßig (Weise 1971). Anschließend verändert man zuerst die Einstellung des unteren, danach die Einstellung des oberen Fensters so lange, bis der Ausdruck

$$(1) \quad z = \frac{N_1 - N_0}{\sqrt{(N_1 + N_0)}}$$

ein Maximum erreicht. Formel (1) entspricht Formel 1.185 a bei Sachs (1972) und prüft, ob die Mittelwerte zweier Poissonverteilungen signifikant voneinander verschieden sind. Mit dieser Methode wurde für das vorhandene Zählgerät eine Fenstereinstellung von 48 - 100 keV als optimal ermittelt. Mit dieser Fenstereinstellung muß jedoch nachträglich geprüft werden, ob eine der wesentlichen Voraussetzungen für die Anwendbarkeit von (1) noch gilt: N_1/t und N_0/t müssen Mittelwerte von Verteilungen sein, die sich noch als Poissonverteilungen auffassen lassen. Es ist bekannt, daß die Filtercharakteristik eines Zählgerätes die Poissonverteilung eines radioaktiven Zerfallsprozesses so stark verzerrt an den Zähler weitergeben kann, daß der Poissoncharakter verloren geht. Eine entsprechende Prüfung wurde mit einem Chi-Quadrat-Test nach der von Weise (1971, Formel 8.23) angegebenen Methode durchgeführt; die Annahme einer Poissonverteilung auch für die Zählimpulse war danach gerechtfertigt.

Die Radioaktivität R wurde berechnet nach

$$(2) \quad R = \frac{N_1 - N_0}{t(g_1 - g_2)}$$

In dieser Formel bedeutet t die Zählzeit (50 min), N_1 Zählimpulse eines gefüllten Probengefäßes in t, N_0 Zählimpulse eines leeren Gefäßes in t, g_1 Gewicht des leeren Gefäßes, g_2 Gewicht eines gefüllten Gefäßes. Zur Berechnung der Standardabweichung wurde von folgender allgemeiner Überlegung ausgegangen:

Wenn F eine Funktion der Variablen $x_1 \dots x_n$ ist, und wenn $s(x_1) \dots s(x_n)$ die Standardabweichungen der $x_1 \dots x_n$ sind, dann berechnet man die Standardabweichung von F nach

$$(3) \quad s(F) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left[\frac{\partial F}{\partial x_i} \cdot s(x_i) \right]^2}$$

Für die Anwendung von (3) auf (2) wurde angenommen:

$s(t)=0$, $s(g_1)=s(g_2)=s(g)$, $s(N_1)=N_1$ und $s(N_0)=N_0$.

Nach Differenzierung und Umformung erhält man

$$(4) \quad s(R) = R \sqrt{\frac{N_1 + N_0}{(N_1 - N_0)^2} + 2 \frac{s^2(g)}{(g_1 - g_2)^2}}$$

In fast allen Fällen war der zweite Bruch unter der Wurzel viel kleiner als der erste. Unter diesen Umständen kann $s(R)$ als Standardabweichung einer Poissonverteilung, die in eine Normalverteilung übergeht, aufgefaßt werden. Mit dieser Näherung kann man zwei Radioaktivitäten auf einen signifikanten Unterschied prüfen nach der Formel

$$(5) \quad z = \frac{R_1 - R_2}{\sqrt{s^2(R_1) + s^2(R_2)}}$$

worin z die Standardnormalvariable ist. (Vergleiche Weise 1971, Formeln 7.24 und 7.25)

Die zur unmittelbaren praktischen Rechnung notwendigen Formeln (1), (2), (4) und (5) wurden mit einem Tischrechner Olivetti Typ P 101, später Typ 602 auf Magnetkarten programmiert und später die Mittelwerte und Streuungen für alle Proben und die Signifikanz von Aktivitätsunterschieden mit dem programmierten Rechner bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1. Intramuskuläre Injektion von ^{125}J -Tetanustoxin

3.1.1. Radioaktivität in den Mm. gastrocnemii

Ein großer Teil des intramuskulär injizierten Tetanustoxin befand sich nach 24 Stunden noch im injizierten Muskel. Bei 6 Katzen wurden die Mm. gastrocnemii in toto exzidiert und die in ihnen verbliebene Gesamtaktivität gemessen. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 1. Katze No. 28 der Tabelle ist die einzige, die sich nach Applikation des Toxins frei bewegte; die anderen Tiere befanden sich bis zur Sektion in Narkose.

Tab. 1:

Restaktivitäten in den Mm. gastrocnemii 24 h nach Injektion von ^{125}J -Tetanustoxin

Katze No.	M. gastrocn.	injiziert	gefunden cpm
28 (wach)	links	0	338
	rechts	$2,5 \cdot 10^6$	$0,65 \cdot 10^6$
29	links	$2,2 \cdot 10^6$	$1,11 \cdot 10^6$
	rechts	$2,2 \cdot 10^6$	$1,18 \cdot 10^6$
30	links	$2,5 \cdot 10^6$	$1,02 \cdot 10^6$
	rechts	$2,5 \cdot 10^6$	$1,01 \cdot 10^6$
31	links	$3,0 \cdot 10^6$	$1,73 \cdot 10^6$
	rechts	$3,0 \cdot 10^6$	$1,38 \cdot 10^6$
34	links	$3,0 \cdot 10^6$	$1,08 \cdot 10^6$
	rechts	$3,0 \cdot 10^6$	$0,97 \cdot 10^6$
41	links	$2,4 \cdot 10^6$	$1,13 \cdot 10^6$
	rechts	$2,4 \cdot 10^6$	$1,31 \cdot 10^6$

Tab. 1 zeigt, daß ein großer Anteil der injizierten Toxinmenge während der Versuchsdauer im Muskel verbleibt.

3.1.2. Radioaktivität in den Nn. ischiadici

Der Aktivitätsverlauf in den Nn. ischiadici wurde als Funktion des Abstandes vom M. gastrocnemius bei 44 Nerven untersucht. Ein typisches Einzelbeispiel zeigt Abb. 2. Diese Abbildung ist repräsentativ für 31 der 44 untersuchten Nn. ischiadici inso- weit, als bei ihnen ein Abfall der Aktivität von distal nach proximal beobachtet wurde. Nicht immer war der Kurvenverlauf durchgehend monoton wie in Abb. 2.

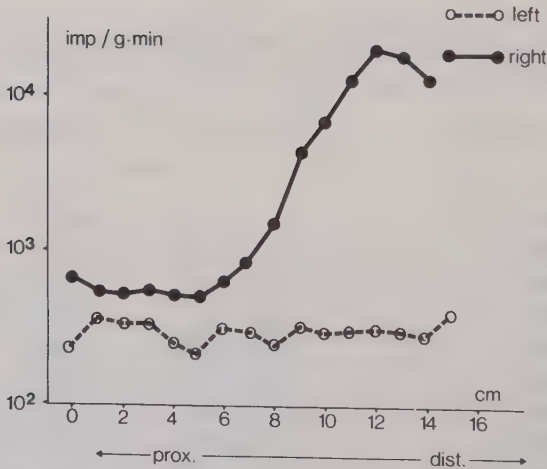


Abb. 2: Radioaktivität in den Nn. ischiadici 29 Stunden nach Injektion von $0,6 \times 10^6$ cpm ^{125}J -Tetanustoxin/kg in den rechten M. gastrocnemius. Katze frei beweglich.

3.1.3. Radioaktivität von Geweben aus der Nachbarschaft des M. gastrocnemius und des N. ischiadicus

Das Gewebe in unmittelbarer Nähe des M. gastrocnemius wurde nicht in toto, sondern nur durch Entnahme von Proben auf Radioaktivität untersucht. Besonders hohe Werte lieferte das Fettgewebe aus der Fossa poplitea; Beispiel: Katze No. 28, Fettgewebe von der injizierten Seite 493 ± 6 cpm/g, von der nichtinjizierten Seite 32 ± 1 cpm/g. Muskulatur, die aus der Mitte der Adduktoren in unmittelbarer Nähe des N. ischiadicus entnommen wurde, hatte keine erhöhte Aktivität (Katzen No. 3, 5).

3.1.4. Radioaktivität in den Ventral- und Dorsalwurzeln

Bei Untersuchung der Ventralwurzeln fand sich z.T. eine sehr große Aktivitätserhöhung auf der zur Injektion ipsilateralen Seite (in 15 von 19 Fällen), die jedoch stets auf die Wurzeln beschränkt blieb, aus denen der M. gastrocnemius motorisch versorgt wird. Dies sind bei der Katze mit wechselnden Anteilen die Wurzeln (und Segmente) L 6, L 7 und S 1. Ein Einzelbeispiel gibt Abb. 3 a. Die Abbildung zeigt gleichzeitig eine sehr geringe Aktivität in den Dorsalwurzeln. Dies würde man nach den klassischen Vorstellungen erwarten, jedoch haben die hier mitgeteilten Experimente gezeigt, daß auch die Aktivität der Dorsalwurzeln beträchtlich werden kann. Hierzu dient Abb. 3 b als Beispiel. Abb. 3 a und Abb. 3 b geben bezüglich der Dorsalwurzelsaktivität die Extreme der vorliegenden Untersuchungen.

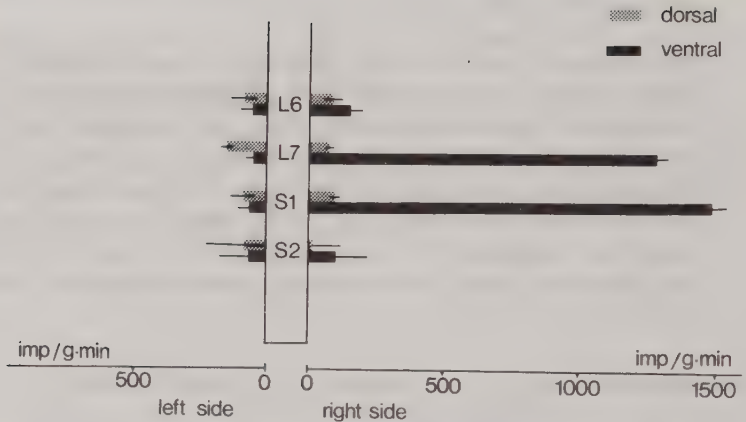


Abb. 3 a: Radioaktivität in den Dorsal- und Ventralwurzeln 24 Stunden nach Injektion von 10^6 cpm ^{125}J -Tetanustoxin/kg in den rechten M. gastrocnemius. Katze zwischen Toxininjektion und Sektion dauernd narkotisiert.

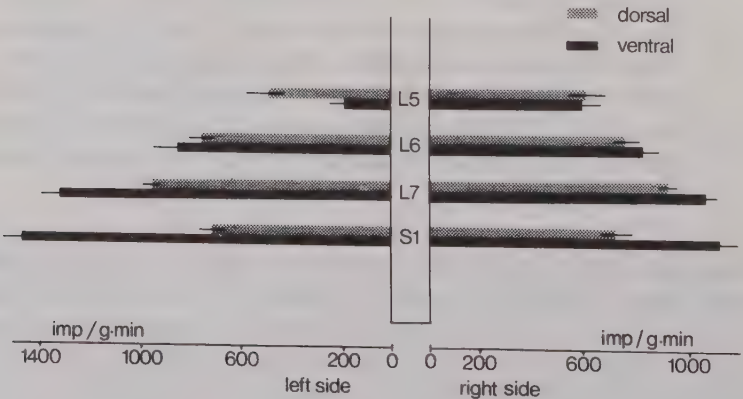


Abb. 3 b: Radioaktivität in den Dorsal- und Ventralwurzeln 24 Stunden nach Injektion von 10^6 cpm ^{125}J -Tetanustoxin/kg in jeden M. gastrocnemius. Katze wie in Abb. 3 a narkotisiert. Man beachte die beachtliche Radioaktivität auch in den Dorsalwurzeln.

3.1.5. Radioaktivität im Rückenmark

In Kenntnis der Ventralwurzelaktivitäten erwartet man eine Aktivitätserhöhung auch in den Rückenmarkssegmenten L 6, L 7 und S 1, aus denen der M. gastrocnemius innerviert wird. Diese Erwartung wurde bei 22 von 22 Tieren ein- oder doppelseitig bestätigt. Die Aktivitätserhöhung konnte in einem, zwei oder allen drei Segmenten auftreten. Sie war erhöht in L 6 insgesamt 8 mal, in L 7 30 mal und in S 1 30 mal. Bei doppelseitigen Experimenten lag der Aktivitätsgipfel 9 mal im gleichen und 3 mal nicht im gleichen Segment. Ein Einzelbeispiel für die Verteilung der Aktivität auf die Rückenmarkssegmente gibt Abb. 4.

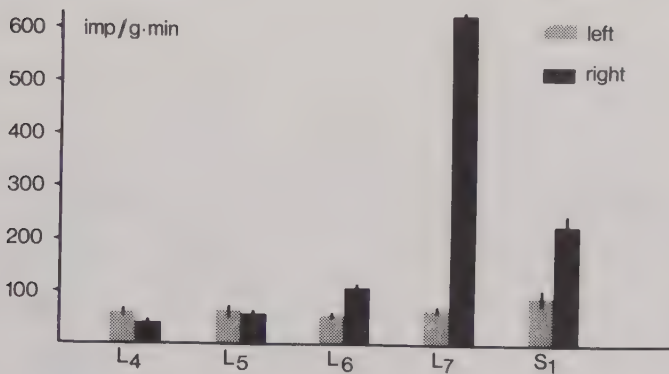


Abb. 4: Radioaktivität in Rückenmarkshalbsegmenten 24 Stunden nach Injektion von 10^6 cpm ^{125}J -Tetanustoxin in den rechten M. gastrocnemius.

Abb. 4 dokumentiert noch einen zweiten Befund: Innerhalb von 24 h bleibt die Aktivitätserhöhung auf die versorgenden Segmente der zum Muskel ipsilateralen Seite des Rückenmarks beschränkt; auf der kontralateralen Seite gibt es keine Aktivitätserhöhung. Diese Aussage wurde an insgesamt 6 Tieren überprüft; sie traf in allen Fällen zu.

Beim Vergleich der Befunde an Ventral- und Dorsalwurzeln mit den am Rückenmark erhobenen liegt die Annahme nahe, daß den Ventralwurzeln für die Aszension des Toxins in das Rückenmark größere Bedeutung zukommt als den Dorsalwurzeln. Der Prüfung dieser Hypothese dienten Versuche an 4 Katzen, deren Ventralwurzeln durchtrennt oder unterbunden waren und denen Toxin in beide Mm. gastrocnemici injiziert wurde. In allen Versuchen blieb die Anreicherung von Radioaktivität in den muskelversorgenden Rückenmarkssegmenten völlig aus.

.

3.2. Kontrollversuche

3.2.1. Blockade der Radioaktivitätszunahme im Rückenmark durch Tetanusantitoxin

Zur Klärung der Frage, in wechem Umfang die in Nerven, Wurzeln und Rückenmark gemessene Radioaktivität an immunreaktives Protein gebunden ist, wurde bei einem Tier versucht, die Aszension der Radioaktivität durch Tetanusantitoxin zu blockieren. Abb. 5 zeigt die Aktivität in Rückenmarkssegmenten bei einem Versuch, in dem Toxin intramuskulär und gleichzeitig Antitoxin intravenös injiziert wurde. Im Vergleich zu Abb. 4 ist die Anreicherung fast völlig aufgehoben (und nur in L 7 bei $P=0,05$ gerade noch signifikant).

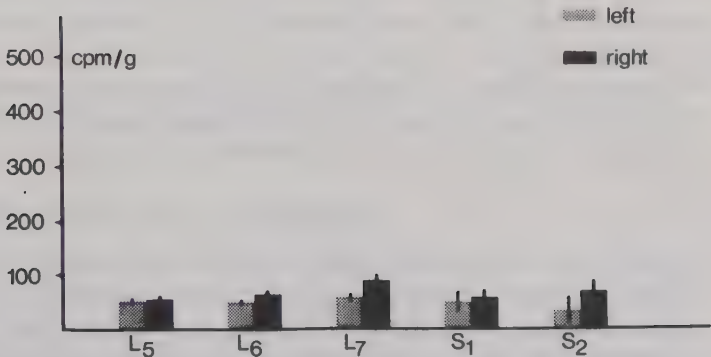


Abb. 5: Radioaktivität in den Rückenmarkshalbsegmenten 24 Stunden nach Injektion von 10^6 cpm ^{125}J Tetanustoxin/kg in den rechten M. gastrocnemius und von 50 000 IU Tetanusantitoxin/kg in die V. jugularis. Katze frei beweglich

3.2.2. Injektion von Na^{125}J in den M. gastrocnemius

In zwei Versuchen mit Injektion von Na^{125}J in den M. gastrocnemius blieb eine Anreicherung von Radioaktivität im Rückenmark aus. Auch in den Wurzeln war die Aktivität nicht höher als auf der Kontrollseite.

3.2.3. Injektion von ^{125}J -Tetanusantitoxin in den M. gastrocnemius

Man kann fragen, ob eine Anreicherung von Radioaktivität auch nach intramuskulärer Injektion anderer Proteine beobachtet werden kann. Exemplarisch wurde in der vorliegenden Arbeit ^{125}J -Tetanusantitoxin geprüft. Antitoxin (Fermoserum) wurde von Prof. Habermann mit ^{125}J markiert und hatte eine Radioaktivität von 2×10^4 cpm/ul (Fenster bei 48 und 100 keV). Tabelle 2 zeigt, daß eine Anreicherung im Rückenmark sicher nicht erfolgt. Das gleiche gilt für die Wurzeln; nur in der fossa poplitea gelegene Anteile des N. ischiadicus weisen eine erhöhte Aktivität auf.

Tabelle 2

Aktivität (cpm/g) in Rückenmarkssegmenten 24 h nach Injektion von $3 \cdot 10^6$ cpm entspr. 150 ul ^{125}J -Tetanusantitoxin in den rechten M. gastrocnemius einer Katze (3,0 kg).

	links	rechts
S 1	$24^{\pm} 14$	$9^{\pm} 14$
L 7	$20^{\pm} 6$	$18^{\pm} 6$
L 6	$21^{\pm} 5$	$18^{\pm} 5$
L 5	$18^{\pm} 5$	$19^{\pm} 3$
L 4	$21^{\pm} 4$	$15^{\pm} 4$

3.3. Der Einfluß neuromuskulärer Aktivität auf die Aszension von ^{125}J -Tetanustoxin

3.3.1. Vorbemerkungen zum Versuchsplan

Bei Auswertung der Versuche über die Aszension von ^{125}J -Tetanustoxin nach intramuskulärer Injektion war aufgefallen, daß eine während des ganzen Versuches bestehende Narkose die Anreicherung von Radioaktivität im Rückenmark zu beeinträchtigen schien. Dieser Eindruck ergab sich jedoch durch Vergleich der Ergebnisse von mehreren Katzen, wodurch statistisch eine weitere Streuung, nämlich die Streuung zwischen den Tieren, wirksam wurde. Sie hätte sich nur durch Experimente mit vielen Katzen hinreichend verkleinern lassen, um signifikante Aussagen zu gestatten. Ein solcher Versuchsplan ist nur bei Verwendung kleiner Nager vertretbar, in aller Regel aber nicht bei der Verwendung größerer Säugetiere. Deshalb wurde nach einem besseren Versuchsplan verfahren, der auf dem paarweisen Vergleich von Meßwerten der linken mit denen der rechten Körperhälfte beruht. Diese Versuchsanlage geht von der (bereits unter 3.1.5. bewiesenen) Voraussetzung aus, daß innerhalb der Toxin-Einwirkzeit von 24-30 Stunden die segmentale Anreicherung der Radioaktivität ipsilateral bleibt und nicht auf die kontralaterale Seite übergreift.

3.3.2. Direkte Reizung des M. gastrocnemius

Zunächst wurden bei 2 Katzen (Narkose von der Toxininjektion bis zur Sektion) gleiche Mengen ^{125}J -Tetanustoxin in beide Mm. gastrocnemici injiziert und der linke M. gastrocnemius während der Toxinwirkungszeit über Platindrahtelektroden gereizt. In dieser Versuchsanordnung werden sowohl die Muskelzellen als auch die afferenten Nerven orthodrom und die efferenten Nerven antidrom erregt. Die Reizung führte bei beiden Katzen zu einem starken und hochsignifikanten Überwiegen der Radioaktivität in den ipsilateralen Rückenmarkssegmenten, aus denen der Muskel versorgt wird (Abb. 6). Das gleiche gilt sinngemäß für die Ventralwurzeln.

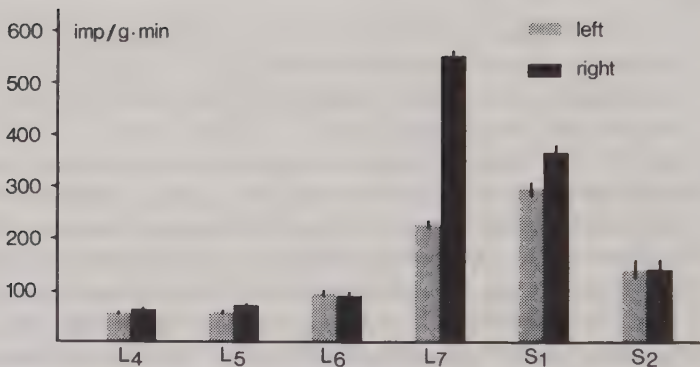


Abb. 6: Radioaktivität in den Rückenmarkshalbsegmenten 24 Stunden nach Injektion von 10^6 cpm ^{125}J -Tetanustoxin/kg in jeden M. gastrocnemius. Katze durchgehend in Narkose, rechter M. gastroc. fortlaufend mit Impulsgruppen gereizt.

Die Anreicherung von Radioaktivität in dieser Versuchsanordnung ist an die Kontinuität der Ventralwurzeln gebunden, wie zwei weitere Versuche zeigten, in denen die Ventralwurzeln L 5 - S 2 beidseitig unterbunden waren: Hier unterschieden sich die Rückenmarkssegmente der stimulierten Seite in ihrer Radioaktivität nicht von denen der nichtstimulierten Seite, und darüberhinaus war auf beiden Seiten eine segmentale Anreicherung überhaupt ausgeblieben (Tabelle 3).

Tabelle 3: Radioaktivität in Rückenmarkssegmenten von 4 Katzen, denen allen 10^6 cpm ^{125}J -Tetanustoxin/kg in jeden M. gastrocnemius injiziert wurde. Auf einer Seite wurde der M. gastrocnemius danach fortlaufend mit Impulsgruppen gereizt. Die Vorderwurzeln waren bei Katze No. 30 und 60 erhalten, bei Katze No. 63 und 64 durchtrennt.

Katze No.	Segment		
	links		rechts
30; Reizung rechts	89 $\pm$ 9	L 6	326 $\pm$ 11
	301 $\pm$ 12	L 7	370 $\pm$ 13
	96 $\pm$ 13	S 1	81 $\pm$ 12
60; Reizung links	86 $\pm$ 6	L 6	91 $\pm$ 6
	547 $\pm$ 12	L 7	229 $\pm$ 9
	361 $\pm$ 14	S 1	292 $\pm$ 14
63; Reizung links VW beiderseits durchtrennt	179 $\pm$ 6	L 6	159 $\pm$ 6
	172 $\pm$ 7	L 7	166 $\pm$ 8
	185 $\pm$ 15	S 1	129 $\pm$ 14
64; Reizung links VW beiderseits durchtrennt	135 $\pm$ 6	L 6	116 $\pm$ 6
	149 $\pm$ 9	L 7	145 $\pm$ 9
	183 $\pm$ 16	S 1	128 $\pm$ 15

3.3.3. Orthodrome Reizung des N. ischiadicus

Angesichts der in 3.3.2. gezeigten Bedeutung der Ventralwurzeln war wichtig zu prüfen, ob der fördernde Effekt auch bei orthodromer Reizung der spinalen Efferenzen zustande käme. Hierzu wurden bei zwei Katzen gleiche Dosen ^{125}J -Tetanustoxin in den linken und rechten M. gastrocnemius injiziert und der linke N. ischiadicus in Höhe des Trochanter über Platindrahtelektroden mit Salven gereizt (Narkose von der Toxininjektion bis zur Sektion). Die Reizung führte bei beiden Katzen zu einem signifikanten Überwiegen der Radioaktivität in den Rückenmarkssegmenten (L 7, bzw. L 7 und S 1) der stimulierten Seite, die jedoch im Vergleich zu den Experimenten mit direkter Reizung

der Muskulatur geringer ausfiel (Tabelle 4).

Tab. 4: Radioaktivitäten in Rückenmarkshalbsegmenten und Vorderwurzeln nach fortlaufender Reizung des linken N. ischiadicus mit Impulsgruppen. Beide Katzen erhielten 10^6 cpm ^{125}J -Tetanustoxin/kg in jeden M. gastrocnemius injiziert.

Katze No. 8,		Rückenmarkshalbsegmente	
	links		rechts
	160 ± 11	L6	149 ± 7
	450 ± 12	L7	299 ± 9
	230 ± 24	S1	290 ± 25
Katze No. 10,		Vorderwurzeln	
	210 ± 20	VWL7	142 ± 17
	258 ± 28	VWS1	106 ± 25

Bei Katze 8 bestanden sinngemäß auch signifikante Unterschiede in der Aktivität der Ventralwurzeln L 7 und S 1. Die Bedeutung der Ventralwurzeln wurde wiederum an zwei weiteren Tieren demonstriert: Bei ihnen wurden die Ventralwurzeln L 5 - S 2 auf beiden Seiten durchtrennt und linksseitig orthodrom mit Salven gereizt. Nach 24 h unterschieden sich die linken und rechten Rückenmarkssegmente nicht in ihrer Radioaktivität.

3.3.4. Reizung der Flexoren und Adduktoren des Oberschenkels

Um auszuschließen, daß bei Reizung des N. ischiadicus die Kontraktion der Adduktoren und Flexoren mechanisch den Toxintransport beeinflusst, wurde in zwei weiteren Versuchen ^{125}J -Tetanustoxin in beide Mm. gastrocnemii injiziert, die Hamstring-Nerven beidseitig zwischen Ligaturen durchtrennt und der periphere Stumpf linksseitig mit Salven gereizt. Abb. 7 zeigt, daß dies auf die Anreicherung von Radioaktivität in den relevanten Rückenmarkssegmenten keinen Einfluß hatte: die Segmente der rechten und der linken Seite unterschieden sich hierin nicht.

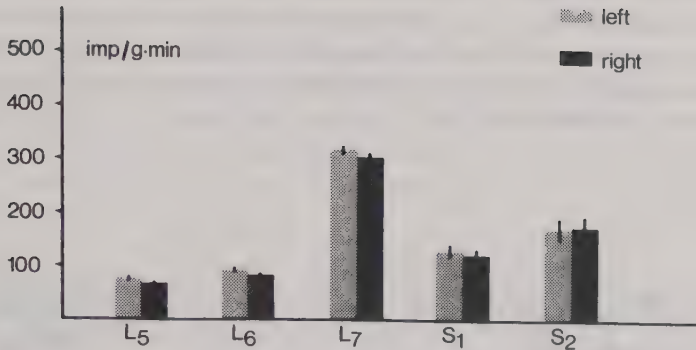


Abb. 7: Radioaktivität in Rückenmarkshalbsegmenten 24 Stunden nach Injektion von 10^6 cpm ^{125}J -Tetanustoxin/kg in jeden M. gastrocnemius. Beide Hamstring-Nerven durchtrennt, peripherer Stumpf des rechten Hamstring-Nerven fortlaufend mit Impulsgruppen gereizt.

3.3.5. Reflektorischer Antrieb der Efferenzen zum M. gastrocnemius am relaxierten Tier

In den Versuchen mit Reizung des N. ischiadicus war am Versuchsende ein Ödem des Nerven an der Anlagestelle der Elektrode nicht zu übersehen. Es erschien deshalb notwendig, den Versuch sinngemäß mit anderer Lage der Reizelektrode zu wiederholen. Dies geschah an zwei Tieren, bei denen nach beidseitiger Durchschneidung der Dorsalwurzeln die Dorsalwurzeln der linken Seite orthodrom gereizt wurden. Um jedoch eine zusätzliche Information zu erhalten, wurden die Tiere während

der Versuchsdauer voll relaxiert. Die Existenz der reflektori-
schen polysynaptischen Entladung in den M. gastrocnemius und
der vollständigen Blockade der neuromuskulären Übertragung wur-
den elektromyographisch über die Dauer des gesamten Versuches
kontrolliert. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen,
daß die elektromyographische Kontrolle der mechanischen Kontrol-
le weit überlegen war. Ungeachtet der Relaxation war der reflek-
torische Antrieb der Gastrocnemiusafferenzen allein noch immer
ausreichend, um die Anreicherung von Radioaktivität in den ip-
silateralen Rückenmarkssegmenten im Vergleich zur Kontrollsei-
te zu erhöhen (Abb. 8).

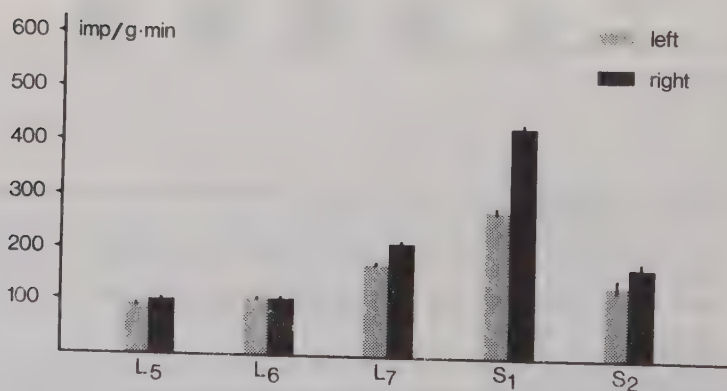


Abb. 8: Radioaktivität in Rückenmarkshalbsegmenten 24 Stunden nach Injektion von 10^6 cpm ^{125}J -Tetanustoxin/kg in jeden M. gastrocnemius. Katze narkotisiert und voll relaxiert; Dorsalwurzeln L 6 - S 1 auf beiden Seiten durchtrennt, die rechte Dorsalwurzel L 7 wurde fortlaufend mit Impulsgruppen orthodrom gereizt.

3.3.6. Antidrome Reizung der Dorsalwurzeln

Die Vollständigkeit der neuromuskulären Blockade nach Gabe von Muskelrelaxantien wird sich nur schwer mit letzter Sicherheit beweisen lassen. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, wurde ein Verfahren gewählt, das aus dem Blickwinkel der klassischen Neurophysiologie zunächst wenig sinnvoll erscheint: Drei narkotisierte Katzen erhielten wie üblich in den linken und rechten M. gastrocnemius die gleiche Dosis ^{125}J -Tetanustoxin injiziert, danach wurden die Dorsalwurzeln L 6 - S 2 auf beiden Seiten rückenmarksnahe durchtrennt und die Dorsalwurzeln der linken Seite antidrom gereizt. Diese antidrome Dorsalwurzelreizung führte bei allen drei Katzen zu einer im Vergleich zur nichtgereizten Kontrollseite erheblich höheren Radioaktivität der ipsilateralen relevanten Rückenmarkssegmente. Ein Beispiel gibt Abb. 9.

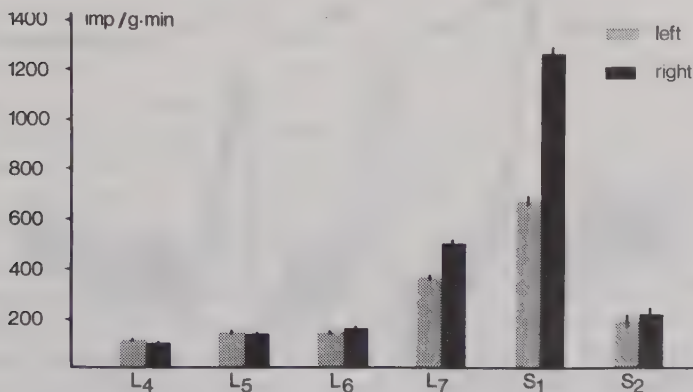


Abb. 9: Radioaktivität in Rückenmarkshalbsegmenten 24 Stunden nach Injektion von 10^6 cpm ^{125}J -Tetanustoxin/kg in jeden M. gastrocnemius. Katze narkotisiert; Dorsalwurzeln L 5 - S 2 auf beiden Seiten durchtrennt; die rechten Dorsalwurzeln L 6 - S 1 wurden fortlaufend mit Impulsgruppen antidrom gereizt.

Zwei der drei Tiere waren zusätzlich relaxiert (Alloferin + Flaxedil). In allen Fällen wurde fortlaufend das Elektromyogramm aus dem M. gastrocnemius der linken Seite auf dem Oszillographenschirm dargestellt und beobachtet. Weder im relaxierten noch im unrelaxierten Zustand wurde irgendein Hinweis auf eine Aktivierung muskulärer Elemente gefunden (Abb. 10).

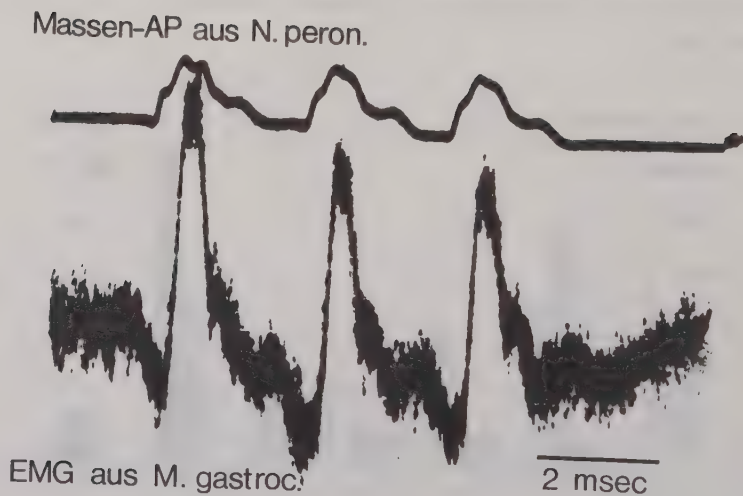


Abb. 10: Elektromyographische Sicherung der fehlenden ephaptischen Erregung der Skelettmuskulatur bei antidromer Dorsalwurzelreizung. Ableitungsparameter wie in Abb. 1.

In zwei ergänzenden Versuchen wurde informatorisch geprüft, ob sich nach antidromer Reizung der Dorsalwurzeln L 7 und S 1 eine Zunahme der Durchblutung in M. gastrocnemius der ipsilateralen Seite nachweisen ließ. Dies geschah mit einer Thermosonde, die an ein geeignetes Verstärker- und Registrier-

system (Fluvograph^R) angeschlossen war. Während auf Injektion einer Testdosis von Adrenalin eine Erhöhung der Muskeldurchblutung deutlich gezeigt wurde, blieb die antidrome Dorsalwurzelreizung ohne jeden Einfluß.

Durch Einsatz von Lokalanaesthetica ergaben sich Hinweise auf die relative Bedeutung der terminalen und nicht terminalen Anteile des Nerven bei reizbedingter Förderung der Aktivitätsanreicherung im Rückenmark. Die Versuche mit antidromer Aktivierung der Dorsalwurzeln wurden in folgender Modifikation fortgesetzt: Nach intramuskulärer Injektion gleicher Dosen von ¹²⁵J-Tetanustoxin in beide Mm. gastrocnemici wurden die Dorsalwurzeln L 6, L 7 und S 1 auf beiden Seiten antidrom gereizt; in der linken und rechten Kniekehle wurde der N. ischiadicus an der Abgangsstelle des N. peroneus nur durch Eröffnen der Muskelnischen exponiert. In beiden Mm. gastrocnemici wurde je ein Paar Nadel-elektroden so eingestochen, daß die differente Elektrode im Gastrocnemiuskopf in unmittelbarer Nähe der Achillessehne lag. Den Reizerfolg der antidromen Dorsalwurzelreizung registriert man dann als Massen-Aktionspotential neurogenen Ursprungs (hohe Leitungsgeschwindigkeit; keine Ermüdbarkeit; keine Summation). Danach wurde über den linken N. ischiadicus ein Tupfer mit 0,5%-iger Tetracainlösung gelegt. Daraufhin nahm die ipsilateral registrierte Reizantwort ab und war nach 20 Minuten vollständig verschwunden. Dies wurde als Ausdruck vollständiger Leitungsanaesthesie angesehen. Die Leitungsanaesthesie wurde während des ganzen weiteren Versuchsablaufs aufrecht erhalten und fortlaufend auf Vollständigkeit beobachtet. Nach 24 h befand sich in den Rückenmarkssegmenten L 7 und S 1 der linken Seite (Leitungsanaesthesie) signifikant weniger Radioaktivität als auf der rechten Seite (Scheinoperation in der Kniekehle) (Tabelle 5).

Tabelle 5: Radioaktivität in Rückenmarkshalbsegmenten 24 Stunden nach Injektion von 10^6 cpm ¹²⁵J-Tetanustoxin in jeden M. gastrocnemius. Katze narkotisiert; Dorsalwurzeln L 6 - S 1 beiderseits durchtrennt und antidrom gereizt; linker N. ischiadicus in Höhe der Kniekehle mit 0,5%iger Tetracainlösung lokalanaesthetisiert.

links	Segment	rechts
139±5	L5	148±4
182±6	L6	237±7
484±11	L7	528±12
159±13	S1	330±12

3.4. Versuche mit intrakutaner Injektion

3.4.1. Einseitige Injektion

Nach Injektion von ^{125}J -Tetanustoxin in die Haut des Thorax (Quaddel) breitete sich das Toxin in der Haut der ipsilateralen Seite vornehmlich nach dorsal und cranial aus, was durch grobe Autoradiographie (Katze No. 23) nachweisbar war. Hierzu wurde die Haut über beiden Thoraxseiten abpräpariert, auf ein Holzbrett gespannt, eingefroren und in der Tiefkühltruhe 24 Stunden auf einen Röntgenfilm gelegt. Die hieraus ersichtliche Toxinausbreitung in dorsaler und cranialer Richtung entspricht der von Ratzlaff (1971) bei der Katze beschriebenen Lymphdrainage des Injektionsgebietes in die axillären Lymphknoten. Die Radioaktivität im regionalen ipsilateralen Lymphknoten sollte folglich im Vergleich zum (kontralateralen) Lymphknoten der Kontrollseite höher sein. Bei 4 Katzen wurde diese Hypothese geprüft. Die außerordentlich starken Aktivitätsunterschiede sind aus der Tabelle 6 ersichtlich.

Tabelle 6: Radioaktivität (cpm/g) in den axillären Lymphknoten der Katze nach intracutaner Injektion von ^{125}J -Tetanustoxin im Bereich des Intercostalraumes IX.

Katze No.	27	33	35	78
Stunden zwischen Injektion und Sektion	23,5	36	37	36
Lymphknoten auf der injizierten Seite	28540 ± 42	28310 ± 178	3937 ± 73	31609 ± 58
Kontrollseite	304 ± 6	435 ± 30	613 ± 14	775 ± 7

Die intrakutane Injektion erfolgte zwar in keinem Fall subkutan, aber dennoch schien es angebracht, die unter der Injektionsstelle liegende Muskulatur auf Radioaktivität zu untersuchen. Es handelt sich bei der oberflächlichen Muskulatur um Anteile des M. abdominis obliquus, der bei der Katze auch durch Zweige des N. intercost. lat. innerviert wird (Sears 1964). Zusätzlich wurden bei Katzen höheren Gewichts aus dem subcutanen Fettgewebe Proben entnommen. Sowohl im Fettgewebe als auch

in der Muskulatur unterhalb der Injektionsstelle war die Radioaktivität zwar weit geringer als in der darüberliegenden Haut, aber deutlich höher als in den zum Vergleich entnommenen Proben aus dem M. gastrocnemius und aus dem Fettgewebe in der Fossa poplitea.

Bei der Ausbreitung des Toxins in der Haut war weiterhin zu erwarten, daß eine im Vergleich zur kontralateralen Seite höhere Radioaktivität in mehreren Intercostalnerven und in mehreren thorakalen Rückenmarkssegmenten auftreten würde. Ein bestätigendes Einzelbeispiel ist der Versuch an Katze No. 78, dessen wesentliche Ergebnisse aus Abb. 11 und 12 ersichtlich sind. Die Verteilung der Radioaktivität in den Nn. intercost. lat. und in den Nn. intercost. int. proximal und distal der Abgänge der Nn. intercost. lat. entspricht genau der Erwartung: Unter der Injektionsstelle ist sie am höchsten und fällt nach caudal und cranial ab. Bemerkenswert ist nochmals ein leichter Anstieg im zweiten und dritten Intercostalraum. Auf der nichtinjizierten Seite ist die Radioaktivität der Intercostalnervestücke gering und unabhängig von der Höhe des Intercostalraumes. Der für Abb. 11 relevante Versuch 78 wurde in gleicher Form (einseitige Toxininjektion, keine Denervierung) 8 mal wiederholt. Die Aktivitätsverteilung in den Intercostalnervestücken entsprach in allen Fällen der in Abb. 11 wiedergegebenen. Auffällig war ein Anstieg der Aktivität in Teilen des dritten ICR, der zum Teil auch auf der Kontrollseite deutlich wurde.

Nach den Ergebnissen der Aktivitätsmessungen in den Intercostalnervestücken war zu vermuten, daß nach einseitiger Toxininjektion eine Aktivitätserhöhung auch in den ipsilateralen Rückenmarkssegmenten auftrat. Diese Erwartung bestätigte sich in acht von acht Experimenten. Abb. 12 gibt ein Einzelbeispiel. Es wurde ausgewählt, weil in ihm ein unerwarteter Aktivitätsanstieg in Th 3 besonders deutlich wird, der weniger eindrucksvoll jedoch auch bei den anderen Katzen auftrat. Im übrigen entspricht die Aktivitätserhöhung der in Abb. 12 für die Nerven dargestellten qualitativ (gleiches Versuchstier No. 78), der Gipfel ist jedoch bei weitem nicht so steil.

Abb. 11: Radioaktivität in Interkostalnerven 36 Stunden nach Injektion von 10^6 cpm ^{125}J -Tetanustoxin/kg intracutan über dem rechten Intercostalraum IX.

- A) Nn. intercostales laterales
- B) Nn. intercostales interni distales
- C) Nn. intercostales interni proximales

Abb. 11 A

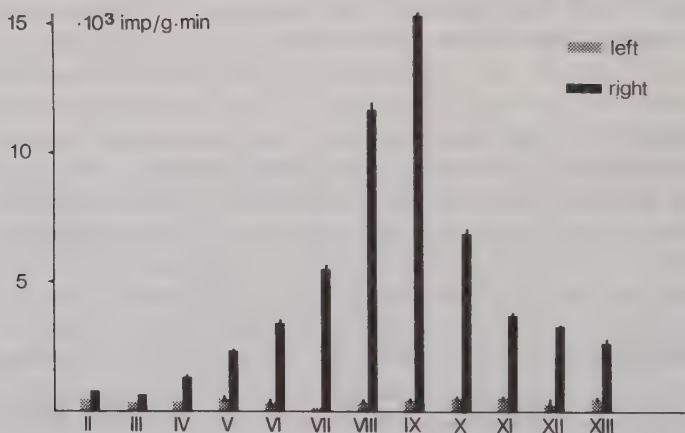


Abb. 11 B

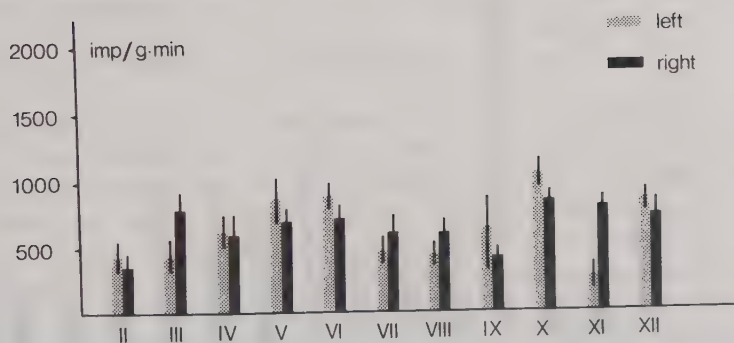
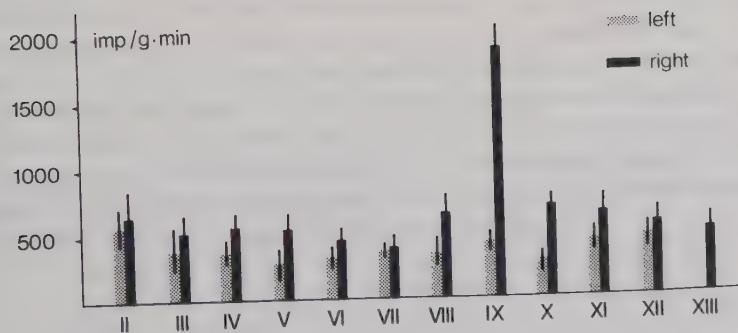


Abb. 11 C



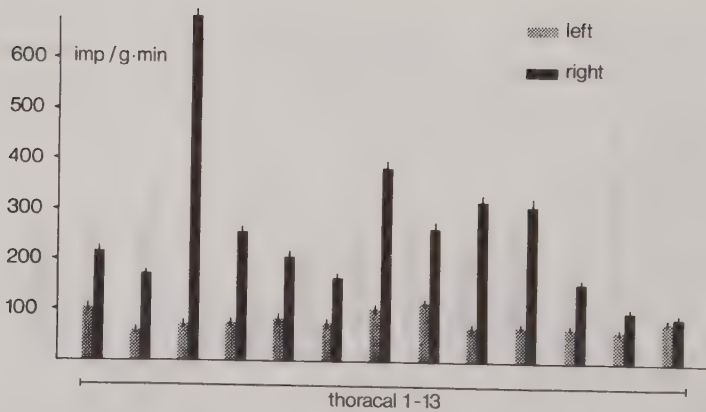


Abb. 12: Radioaktivität in Rückenmarkshalbsegmenten 36 Stunden nach Injektion von 10^6 cpm ^{125}J -Tetanustoxin/kg in die Haut über dem Intercostalraum IX.

3.4.2. Kontrollversuch

In einem Kontrollversuch wurde Na ^{125}J einseitig über dem neunten ICR intracutan injiziert. Eine Anreicherung in den ipsilateralen Nerven oder im Rückenmark war nicht signifikant.

3.4.3. Doppelseitige Injektion und einseitige Ligatur

Bei sechs weiteren Katzen wurde die Versuchsanordnung variiert: Auf einer Thoraxseite wurden die Nn. intercostales lat. II-XIII hautnah unterbunden, auf der anderen Seite nur scheinoperiert, danach die Wunde verschlossen und ^{125}J -Tetanustoxin symmetrisch in gleichen Dosen über dem gleichen linken und rechten ICR injiziert. Die Aktivitäten in den Stücken des Nn. intercost. lat. (die auf der unterbundenen Seite proximal der Ligaturen entnommen wurden) verhielt sich in der Nähe der Injektionsstelle erwartungsgemäß: Dort waren sie in allen sechs Versuchen auf der unterbundenen Seite geringer als auf der scheinoperierten. In einigem Abstand von der Injektionsstelle jedoch waren sie gleich oder sogar größer. Dieser paradoxe Befund trat bei den proximalen Stücken des N. intercost. int. gleichfalls auf und war hier am häufigsten.

Wie schon nach der Aktivitätsverteilung in den Intercostalnervenstücken zu erwarten, hatte die einseitige Ligatur der Nn. intercost. lat. auf die Aktivitätsverteilung im Rückenmark nach doppelseitiger intrakutaner Toxininjektion einen geringen (Versuche No. 37, 61 und 71) oder keinen (Versuche No. 70, 72 und 75) Effekt. Die Werte für die signifikant unterschiedlich aktiven Segmente der Versuche 37, 61 und 71 sind in Tabelle 7 angegeben. Es ist darauf hinzuweisen, daß bei den Tieren der Tabelle 7 Aktivitätsunterschiede auch in anderen Segmenten bestanden, die aber nicht signifikant waren.

Tabelle 7: Rückenmarkssegmente mit signifikanten ($P < 0,05$) Unterschieden in der Radioaktivität nach Injektion von 10^6 cpm ^{125}J -Tetanustoxin/kg intrakutan beidseitig über den Inter-costalräumen X (z Standardnormalvariable).

		cpm/g Radioaktivität in der			z
		ligierten Seite	nicht lig.	Seite	
Katze No. 37 (Inj. Th 10)	Th 10:	43 $\pm$ 6	84 $\pm$ 9		3,79
Katze No. 61 (Inj. Th 10)	Th 12:	122 $\pm$ 19	181 $\pm$ 17		2,31
	Th 13:	133 $\pm$ 17	222 $\pm$ 19		3,49
Katze No. 71	Th 11:	79 $\pm$ 7	102 $\pm$ 8		2,16

3.5. Untersuchungen mit subseröser Injektion von ^{125}J -Tetanustoxin

3.5.1. Radioaktivität in den Vagusnerven

Nach subseröser Injektion von Tetanustoxin an der kleinen Kurvatur des Magens stieg die Radioaktivität im linken N. vagus im Vergleich zu einem anderen peripheren Nerven (Kontrolle) stark an. Ein deutlicher, wenn auch geringer Anstieg wurde jedoch auch im rechten N. vagus gefunden. Nach Mc Crea (1924/25) wird bei der Katze die vordere Magenwand hauptsächlich vom linken, aber auch von einem Ast des rechten N. vagus versorgt. Tabelle 8 gibt hierzu ein Einzelbeispiel.

Es ist weiterhin bemerkenswert, daß zwar in Analogie zum gemischtmotorischen Nerven die Radioaktivität von distal nach proximal zunächst abfällt, dann aber nach Durchlaufen eines Minimums wieder ansteigt und in der Nähe des ZNS höhere Werte erreicht. Postuliert man an der Stelle des Minimums ein "Abflußhindernis", so sollte nach einer künstlich geschaffenen Flußbehinderung durch einseitige Unterbindung des Vagusnerven die Radioaktivität distal der Unterbindungsstelle hoch sein. Die Zahlen der Tabelle 9 bestätigen diese Vermutung. Bei den Tieren mit rechtsseitiger cervikaler Ligatur des N. vagus haben die distal der Ligatur gelegenen Nervenstücke eine rund 1,5 mal höhere Radioaktivität als die proximalen. Wie in der Methodik beschrieben, waren die Nervenstücke 2 cm lang. Hätte man nur wenige Millimeter lange Nervenstücke distal und proximal der Un-

terbindungsstelle miteinander verglichen, so wäre der Aktivitätsunterschied eventuell noch größer ausgefallen.

Tabelle 8: Radioaktivität ($\pm$ Streuung verschiedener Gewebeproben in cpm/g 33 Stunden nach Injektion von 10^6 cpm ^{125}J -Tetanustoxin (entspr. 2 ug Toxin)/kg subserös an der kleinen Kurvatur des Magens. Katze No. 40.

N. vagus	links		rechts	
distal (Magen)	1735 $\pm$	51	1230 $\pm$	97
	1870 $\pm$	76	775 $\pm$	95
	1270 $\pm$	90	585 $\pm$	68
	1069 $\pm$	107	645 $\pm$	49
	702 $\pm$	61	651 $\pm$	58
	689 $\pm$	79	733 $\pm$	66
	789 $\pm$	93	646 $\pm$	68
	776 $\pm$	62	627 $\pm$	101
	875 $\pm$	65	513 $\pm$	92
	971 $\pm$	79	543 $\pm$	77
	852 $\pm$	84	1092 $\pm$	92
proximal (ZNS)	1069 $\pm$	48	1276 $\pm$	97
N. ischiad. (Kontr.)	491 $\pm$	9	494 $\pm$	10
Zwerchfell	692 $\pm$	4	546 $\pm$	4
M. gastroc. (Kontr.)		139 $\pm$	2	
Medulla oblongata				
mit Vaguskerengebiet	93 $\pm$	1	72 $\pm$	1
Rückenmark (Kontr.)			44 $\pm$	1
Blutplasma			4433 $\pm$	27

Tabelle 9: Radioaktivität (cpm/g) in 2 cm Stücken des N. vagus proximal und distal einer Ligatur im Halsbereich und in 2 cm Stücken eines nicht ligierten Nerven (in gleicher Höhe). ¹²⁵J-Tetanustoxin wurde an der kleinen Kurvatur des Magens subserös injiziert.

Katze No.	linker N. vagus	rechter N. vagus
50	prox. 1404 [±] 94 dist. 1345 [±] 103	prox. 1158 [±] 52 dist. 2036 [±] 88 ligiert
52	prox. 1386 [±] 52 dist. 1467 [±] 87	prox. 1739 [±] 62 dist. 2433 [±] 35 ligiert
55	prox. 2338 [±] 61 dist. 2348 [±] 136	prox. 1235 [±] 26 dist. 1929 [±] 56 ligiert
59	prox. 1081 [±] 49 dist. 775 [±] 65	prox. 1049 [±] 38 dist. 1614 [±] 55 ligiert

5.2. Radioaktivität in der Medulla oblongata

Die Untersuchung der Radioaktivität in der (das Vaguskernegebiet umfassenden) Medulla oblongata lieferte weniger eindrucksvolle Ergebnisse als die vergleichbaren Untersuchungen am Rückenmark nach intramuskulärer Injektion. Um den Einfluß der Streuung zwischen den Tieren auf das Versuchsergebnis klein zu halten, wurde zunächst ein Nachweis in paariger Versuchsanordnung angestrebt. Beim gleichen Tier wurde die linke und rechte Hälfte der Medulla oblongata untereinander verglichen in der Hoffnung, daß über den linken N. vagus (der das Gebiet der Injektionsstelle innervierte) mehr Toxin in das ZNS gelangen und dort gebunden würde als über den rechten N. vagus. Diese Erwartung erfüllte sich nur bei Katze No. 40, Tabelle 8 ($z=14,84$), nicht aber bei den Katzen No. 45, 48 und 65 ($z < 2,0$).

Im Hinblick auf die bereits mitgeteilte Beobachtung über eine Toxinaszension auch im rechten Vagusnerven wurde die experimentelle Verdeutlichung der erwarteten Asymmetrie durch zusätzliche Unterbindung des rechten N. vagus versucht. Die Katzen No. 50 und 55 dieser Serie hatten in der linken Medulla oblongata eine deutlich höhere Radioaktivität als in der rechten ($z = 4,4$ bzw. $2,21$), nicht jedoch die Katzen 52 und 59 ($z < 2$). Die Tiere 55 und 59 zeigten zusätzlich noch deutliche klinische Symptome (Bradykardie und Salivation).

5.3. Rückenmark

Beim Vergleich der Radioaktivitäten in den rechten mit denen der linken Rückenmarkshalbsegmenten fiel auf:

- a) Bei vier von acht Katzen war die Radioaktivität in Höhe von C 1 auf der linken Seite deutlich höher als auf der rechten.
- b) Bei vier von acht Katzen war die Radioaktivität in Höhe von C 6/7 auf der linken Seite höher als auf der rechten. Dies entsprach der unterschiedlichen Radioaktivität der Zwerchfelhhälften (siehe 3.5.4.).

3.5.4. Radioaktivität in anderen Geweben

Die Radioaktivität im Zwerchfell war erheblich größer als im Kontrollmuskel; die linke Zwerchfelhälfte war stärker radioaktiv als die rechte.

Die medialen retropharyngealen Lymphknoten (Ratzlaff 1970) hatten eine besonders hohe Strahlungsintensität.

Verschiedene Teile des supraspinalen ZNS wiesen bezüglich ihrer Radioaktivität keine Besonderheiten auf.

4. Diskussion

4.1. Die Aszension von Tetanustoxin im Nerven und in den Rückenmarkswurzeln

Die vorliegende Arbeit zeigt bei der Katze, daß Tetanustoxin nach Injektion in den M. gastrocnemius in hoher Konzentration im N. ischiadicus und den Ventralwurzeln erscheint, und daß diese Anreicherung durch gleichzeitige intravenöse Gabe von Tetanusantitoxin reduziert werden kann. Dieses Ergebnis bestätigte die "klassische" Auffassung, wie sie von Bruschettini (1892), Gumprecht (1895), Marie und Morax (1902) sowie Meyer und Ransom (1903) formuliert wurde, insoweit diese Autoren eine neurale Toxinaszension postuliert haben. Zu weitergehenden Postulaten, die sich auf einen extraneuronalen oder intraneuronalen Toxintransport beziehen, sagen die vorliegenden Versuche nichts aus. Wohl aber muß nach den Versuchen mit subseröser Injektion am Magen, deren Ergebnis mit den Beobachtungen von Ambache und Lippold (1949) übereinstimmen, die Auffassung von Meyer und Ransom abgelehnt werden, wonach die Existenz skeletomotorischer Efferenzen in einem peripheren Nerven Voraussetzung für einen Transport von Tetanustoxin sei.

Die Versuche mit intracutaner Toxininjektion zeigen, daß der lokale Tetanus keine hochgradig artifizielle Situation ist, die nur beobachtet wird, wenn eine Verletzung bis in die Muskulatur penetriert. Auch nach "oberflächlichen" Verletzungen der Haut kann sich das Syndrom eines lokalen Tetanus entwickeln.

Die in wechselndem Ausmaß zu beobachtende Radioaktivität in den Dorsalwurzeln spricht gegen alle bisher geäußerten Auffassungen, daß die Spinalganglien für Tetanustoxin eine unüberwindliche Barriere darstellen.

4.2. Die lokale Anreicherung von Tetanustoxin im Rückenmark

Sie erfolgt nach den vorliegenden Untersuchungen in zweifacher Hinsicht lokalisiert.

Erstens bleibt innerhalb der ersten 24 Stunden nach der intramuskulären Injektion die Radioaktivität streng auf der zur Injektion ipsilateralen Seite. Dieser Befund rechtfertigt nachträglich eine Voraussetzung, die seitens der Neurophysiologen und -pharmakologen vielfach gemacht wurde: In Untersuchungen über die Wirkung von Tetanustoxin auf spinale Reflexe wurde angenommen, daß die zur Injektionsstelle kontralaterale Seite des Rückenmarks im Untersuchungszeitraum als "Kontrollseite" angesehen werden kann (Sherrington 1905, Acheson et al. 1942, Brooks et al. 1957, Wilson et al. 1960, Kryzhanovskii und Dyakanova 1964, Sverdlov und Alekseeva 1966, Kano und Takano 1964, Takano und Henatsch 1972, Paar und Wellhöner 1972). Zweitens bleibt im Beobachtungszeitraum die Aktivitätsanreicherung auch in cranio-caudaler Richtung scharf begrenzt auf diejenigen Rückenmarkssegmente, aus denen der injizierte Muskel innerviert wird. Speziell für den M. gastrocnemius decken sich die in 3. gefundenen Wichtungen der Segmente L 6, L 7 und S 1 mit der neurophysiologischen Erfahrung und geben ihr eine quantitative Grundlage. Danach ist mit Postfixation viel häufiger zu rechnen als mit Antefixation. Weiterhin ist bei seitenvergleichenden neurophysiologischen Untersuchungen nicht auszuschließen, daß der M. gastrocnemius der linken Seite den Hauptanteil seiner Innervation aus einem anderen Rückenmarkssegment erhält als der rechte Muskel.

Es wurde unter 3.1.4. gefunden und unter 4.1. diskutiert, daß Tetanustoxin regelmäßig in den Ventralwurzeln L 6, L 7 und S 1 gefunden wurde, jedoch zu wechselnden Anteilen auch in den Dorsalwurzeln. Aus dem Toxingehalt der Wurzeln läßt sich auf deren Bedeutung als "Leitschiene" für die Toxinaszension noch nicht schließen, wohl aber aus den Durchschneidungsversuchen der Abschnitte 3.1.5. und 3.3.3.. Danach kommen die Ventralwurzeln als Leitschiene allein in Betracht und die Dorsalwurzeln nicht.

4.3. Tetanus - Antitoxin

Bei gleichzeitiger Gabe vermag Antitoxin die neurale Aszension und spinale Anreicherung von Tetanustoxin wirkungsvoll zu verhindern (3.2.1.). Dieser Befund steht in Ubereinstimmung mit

den Ergebnissen von Habermann und Dimpfel (1972) an der Ratte. Eine Anreicherung markierten Antitoxins im Rückenmark ließ sich nicht nachweisen (3.2.3.). Hieraus folgt jedoch nicht zwingend, daß Antitoxin auf neuralem Wege das Rückenmark nicht erreicht: Denkbar wäre zumindest, daß es dort hingelangt, aber nicht gebunden wird.

4.4. Aktivität im neuromuskulären System

Die unter 3.3.2. dargestellten Versuche mit direkter Reizung des M. gastrocnemius zeigen, daß die Beobachtungen von Ponomarew (1928) richtig waren. Seine Deutung, die von Wright (1953) übernommen wurde, trifft nach dem Ergebnis der vorliegenden Experimente jedoch nicht zu. Die neurale Aktivität genügt vielmehr allein, um die Anreicherung von Tetanustoxin im Rückenmark zu beschleunigen, wie die Versuche sowohl am tief relaxierten Tier als auch mit antidromer Dorsalwurzelreizung zeigen. Eine vermehrte Durchblutung einer Rückenmarkshälfte kann hierfür nicht verantwortlich sein, da bei antidromer Dorsalwurzelreizung das Rückenmark nicht stimuliert wurde. Auch für eine vermehrte Durchblutung der Muskulatur hierbei findet sich weder in der Literatur ein Anhalt noch geben die unter 3.3.6. genannten orientierenden Experimente darauf irgendeinen Hinweis. Für technische Belange läßt sich ableiten, daß eine erhöhte motorische Aktivität bei Tetanuspatienten zur beschleunigten Anreicherung von Tetanustoxin im ZNS führt. Von Spekulationen über die Frage, in welchem Raum des Nerven Toxin assoziiert, wird bewußt abgesehen.

5. Zusammenfassung

1. Bei einseitiger Injektion subletaler Dosen von ^{125}J -Tetanustoxin in den M. gastrocnemius der Katze findet man nach 24 Stunden:
 - a) Im N. ischiadicus der injizierten Seite entwickelte sich ein steiler Gradient von Radioaktivität (RA).
 - b) Die Ventralwurzeln der Rückenmarkshalbsegmente, die den injizierten Muskel versorgten, enthalten eine höhere RA als die kontralateralen Wurzeln.
Bei einigen Katzen traf dieses in wechselndem Ausmaß auch für die Dorsalwurzeln zu.
 - c) Die RA in dem den injizierten Muskel versorgenden Rückenmarkshalbsegmenten ist weit höher als im kontralateralen Halbsegment. Während der Versuchsdauer blieb die RA-Erhöhung streng ipsilateral. Der Radioaktivitätsanstieg konnte entweder durch Tetanusantitoxin, das sofort nach Applikation des Toxins intravenös gegeben wurde, oder durch Ligatur der Ventralwurzeln verhindert werden.
2. Nach einseitiger Injektion von ^{125}J -Tetanusantitoxin oder von Na^{125}J beobachtet man keinen Anstieg der RA in den versorgenden Rückenmarkshalbsegmenten.
3. Nach einseitiger intracutaner Injektion subletaler Dosen von ^{125}J -Tetanustoxin in das Insertionsgebiet eines N. intercostalis lateralis war nach 24 - 48 Stunden zu beobachten: In den Intercostalnerven der injizierten Seite ist die RA weit höher als auf der nicht injizierten Seite. Dieser Unterschied ist am deutlichsten in den Rippenzwischenräumen unter dem Toxindepot. Das gleiche gilt für die Rückenmarkshalbsegmente.
4. Nach beidseitiger intracutaner Injektion von ^{125}J -Tetanustoxin konnte einseitige Ligatur der Nn. intercost.lat. die RA in den Nerven und Rückenmarkshalbsegmenten der ligierten Seite bei einigen Tieren geringfügig herabsetzen.
5. Eine experimentelle Überprüfung der Muskelpumpenhypothese von Ponomarew und Wright mit ^{125}J -Tetanustoxin ergab bei der Katze nach Injektion gleicher Toxindosen in beide Mm.

gastrocnemici folgende Befunde:

- a) Nach direkter Stimulation eines M.gastrocnemius fand sich in den ipsilateralen Rückenmarkshalbsegmenten L 6 - S 1 und in den Ventralwurzeln mehr RA als auf der kontralateralen Seite. Diese Seitendifferenz verschwindet, wenn zu Versuchsbeginn die Ventralwurzeln L 6 - S 1 bilateral unterbunden werden.
- b) Unilaterale elektrische Reizung eines N. ischiadicus hat qualitativ dieselbe Wirkung wie die unter 3) beschriebene direkte Reizung des M. gastrocnemius. Auch in diesem Falle ist das Versuchsergebnis nur bei intakten Ventralwurzeln zu erhalten.
- c) Unilaterale elektrische Reizung des peripheren Stumpfes eines N. hamstring bewirkt keine Seitendifferenz der RA im Rückenmark.
- d) Nach unilateraler orthodromer elektrischer Reizung der Dorsalwurzeln L 6 - S 1 fand sich eine höhere RA in den ipsilateralen Rückenmarkshalbsegmenten L 6 - S 1 auch bei voll curarisierten Tieren.
- e) Einseitige antidrome Reizung der peripheren Stümpfe der Dorsalwurzeln L 6 - S 1 bewirkte eine Erhöhung der RA in den Rückenmarkshalbsegmenten L 6 - S 1 der stimulierten Seite gegenüber der Kontrollseite, obwohl skeletomotorische Aktivität auch im EMG nicht nachweisbar war.
- f) Nach bilateraler antidromer elektrischer Reizung der Dorsalwurzeln L 6 - S 1 und einseitiger Lokalanaesthesie des N. ischiadicus in der Kniekehle wurde eine geringe RA in den Rückenmarkshalbsegmenten der anaesthesierten Seite festgestellt.

Diese Ergebnisse zeigen, daß in Abwesenheit von Muskelaktivität die neurale Aktivität per se die neurale Aszension von Tetanustoxin durch die Ventralwurzeln in das Rückenmark begünstigt.

125J-Tetanustoxin wurde bei der Katze subperitoneal an der Magenvorderwand injiziert. Die Sektion erfolgte 32 - 36 Stunden später.

- a) Die RA im N. vagus erreichte ein Maximum in der Nähe des Magens, durchlief ein Minimum und stieg in der Nähe des

ENS wieder an. Die minimale RA war jedoch fünffach höher als im Kontrollnerven.

- b) Die pontine Region, die die Vaguskerne enthält, enthielt signifikant mehr RA als das Rückenmark in Höhe von Th 1.
- c) Zusätzlich wurde in drei von acht Fällen eine höhere RA in der linken Hälfte der Pons gegenüber der rechten gefunden. Bei den restlichen fünf Katzen bestanden keine signifikanten Seitenunterschiede.

Diese Ergebnisse zeigen, daß Tetanustoxin auch in Teilen von Nerven aufsteigt, die frei von skeletomotorischen oder fusimotorischen Axonen sind.

5. Literaturverzeichnis

1. Abel, J.J., Evans, E.A., Hampil, B. and Lee, F.C.:
Researches on Tetanus: II. The toxin of the bacillus tetani is not transported to the central nervous system by any component of the peripheral nerve trunks.
Bull. John Hopkins Hosp. 56, 84-114 (1935)
2. Acheson, G.H., Ratnoff, O.D., Schoenbach, E.B.:
The localized action on the spinal cord of intramuscularly injected tetanus toxin.
J.Exp.Med. 75, 465-480 (1942)
3. Ambache, N. and Lippold, O.C.J.:
Bradycardia of central origin produced by injections of tetanus toxin into the vagus nerve.
J. Physiol.(Lond.) 108, 186-196 (1949)
4. Bayliss, J.H., Mackintosh, J., Morgan, R.S. and Wright, G.P.:
The effect of sclerosis of the nerve trunk on the ascent of tetanus toxin in the sciatic nerve of rabbits and on the development of local tetanus.
J.Path.Bact. 64, 33-45 (1952)
5. Bizzini, B., Turpin, A. et Raynaud, M.:
Production et purification la toxine tétanique.
Ann.Inst.Pasteur 116, 686-712 (1969)
6. Brightman, M.W., Klatzo, J., Olsson, Y., Reese, T.S.:
The blood-brain barrier to proteins under normal and pathological conditions.
J.Neurol.Sciences 10, 215-240 (1970)
7. Brooks, V.B., Curtis, D.R. and Eccles, J.C.:
The action of tetanus toxin on the inhibition of motoneurons.
J.Physiol.(Lond.) 135, 655-672 (1957)
8. Brunner, C.:
Experimentelle und klinische Studien über den Kopftetanus.
Beitr.zur klin.Chirurgie 2, Heft 1, 83-158 und 269 (1892)

9. Bruschetti, A.:
Sulla diffusione del veleno del tetano nell'
organismo.
La Riforma Medica (Napoli) 8, 256-259 und 270-
273 (1892)
10. Doerr, R., Seidenberg, S. und Malgrassi, Fl.:
Kritische u. experimentelle Studien zur Frage
des Nachweises von Tetanustoxin in peripheren
Nerven.
Zeitschr. f. Hygiene 118, 92-116 (1936)
11. Eccles, J.C., Schmidt, R. and Willis, W.D.:
Presynaptic inhibition on the spinal monosynap-
tic reflex pathway.
J.Physiol. (London) 161, 282-297 (1962)
12. Fedinec, A.A.:
Absorption and distribution of tetanus toxin in
experimental animals.
In Eckmann, L. (Herausg.): Principles on Tetanus
Bern: Huber (1967)
13. Fildes, P. and Ledingham, J.C.G.:
A system of bacteriology in relation to medicine.
London: His Majesty's Stationary Office, Vol III,
298-372 (1929)
14. Golenhofen, K., Hensel, H. und Hildebrandt, G.:
Durchblutungsmessungen mit Wärmeleitsonden.
Stuttgart: Thieme (1963)
15. Gumprecht, F.:
Kritik der neueren Arbeiten über die physiolo-
gischen Wirkungen des Tetanusgiftes.
Deutsche Med. Wschr. 42, 693-694 (1895a)
16. Gumprecht, F.:
Versuche über die physiologischen Wirkungen des
Tetanusgiftes im Organismus.
Pflügers Arch. Ges. Physiol. 59, 105-152
(1895 b)

17. Habermann, E.:
Distribution of ^{125}J -tetanus toxin and ^{125}J -
toxoid in rats with local tetanus, as influen-
ced by antitoxin.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmakol. 272,
75-88 (1972)
18. Habermann, E.:
Pharmakokinetische Besonderheiten des Tetanus-
toxins und ihre Beziehungen zur Pathogenese
des lokalen bzw. generalisierten Tetanus.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharm. 267, 1-19
(1970)
19. Habermann, E. and Dimpfel, W.:
Distribution of ^{125}J -tetanus toxin and ^{125}J -
toxoid in rats with generalized tetanus, as
influenced by antitoxin.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharm., im Druck
(1972)
20. Herbert, D.A. and Mitchell, R.A.:
Blood gas tensions and acid base balance in
awake cats.
J.Appl.Physiol. 30, 434-436 (1971)
21. Kano, M. and Takano, K.:
Gamma activity of the rigid cat caused by te-
tanus toxin.
Jap.J.Physiol. 19, 1-10 (1969)
22. Kirilenko, O.A., Minervin, S.M. and Rozanov, A.Ya.:
Fate of labelled tetanus toxin in animal body.
Fed. Proc. (Transl.Suppl.) 24, 921-924 (1965)
23. Kryzhanovskii, G.N. and D'yakonova, M.V.:
Changes in the efferent pathway of the spinal
cord in tetanus poisoning.
Bull.exp.Biol.Med. (Engl.Übers.) 58, 1021-
1025 (1964)

24. Kryzhanovskii, G.N., Pevnitskii, L.A., Grafnova, V.N. and Polgar, A.A.:
Routes of entrance of tetanus toxin into the central nervous system and some problems connected with the pathogenesis of experimental tetanus. II. Experiments on mice, guinea-pigs, rabbits and cats.
Bull.exp.Biol.Med. (Engl.Übers.) 52, 894-898 (1961)
25. Mangalo, R., Bizzini, B., Turpin, A. and Raynaud, M.:
The molecular weight of tetanus toxin.
Biochim.Biophys.Acta 168, 583-584 (1968)
26. Marie, A. et Morax, V.:
Recherches sur l'absorption de la toxine tétanique.
Ann. Inst.Pasteur 16, 818-832 (1902)
27. Mc Crea, D' Arcy, E.:
The abdominal distribution of the vagus.
J.Anat.Physiol. 59, 18-40 (1924/25)
28. Meyer, H. und Ransom, F.:
Untersuchungen über den Tetanus.
Archiv für exp.Pathologie u.Pharmakol. 49, 369-416 (1903)
29. Meyer, H.H. und Gottlieb, R.:
Die experimentelle Pharmakologie als Grundlage der Arzneibehandlung 4. Auflage.
Berlin/Wien: Urban & Schwarzenberg (1936)
30. Murphy, S.G., Plummer, T.H. and Miller, K.D.:
Physical and chemical characterization of tetanus toxin.
Federation Proc. 27, 268 (1968)
31. Paar, G.H., Wellhöner, H.H.:
The action of tetanus toxin on preganglionic sympathetic reflex discharges.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharm. (im Druck) (1972)

32. Ponomarew, A.W.:
Zur Frage der Pathogenese des Tetanus und des Fortbewegungsmechanismus des Tetanustoxins längs dem Nerven.
Zschr.f.d.ges.exp.Med. 61, 93-106 (1928)
33. Ratzlaff, M.H.:
The superficial lymphatic system of the cat.
Lymphology 3, 151-159 (1970)
34. Sachs, L.:
Statistische Auswertungsmethoden 3. Auflage.
Berlin: Springer (1972), 151-152 ff.
35. Sears, T.A.:
The fibre calibre spectra of the sensory and motor fibres in the intercostal nerves of the cat.
J.Physiol.(Lond.) 172, 150-161 (1964)
36. Sherrington, C.S.:
On reciprocal innervation of antagonistic muscles. 8. note.
Proc.Roy.Soc. (Lond.) Ser.B 76, 269-297 (1905)
37. Sverdlov, Y.S. and Alekseeva, V.I.:
Effect of tetanus toxin on presynaptic inhibition in the spinal cord.
Fed.Proc. (Transl.Suppl.) 25, 931-936 (1966)
38. Takano, K., Henatsch, H.-D.:
Tension-extension diagram of the tetanus-intoxicated muscle of the cat.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharm.(im Druck)
(1972)
39. Weise, L.:
Statistische Auswertung von Kernstrahlungsmessungen.
München/Wien: R.Oldenbourg (1971)
40. Wilson, V.J., Diecke, P.J., Talbot, W.H.:
Action of tetanus toxin in conditioning of spinal motoneurons.
J.Neurophysiol. 23, 659-666 (1960)

41. Wright, Payling, G.:

Nerve trunks as pathways in infection.

Proc.Royal Soc.Med. Vol. 46, 319-330 (1953)

42. Zacks, S.I. and Sheff, M.F.:

Studies on tetanus toxin. III. Intercellular localization of fluorescent labelled tetanus toxin and antitoxin in mice.

Acta Neuropath. 4, 267-277 (1965)

43. Zacks, S.I. and Sheff, M.F.:

Tetanism: Pathobiological Aspects of the action of tetanal toxin in the nervous system and skeletal muscle.

In: Neurosciences Research Vol. III, 210-287, New York/London: Academic Press (1970)

44. Zacks, S.I. and Sheff, M.F.:

Tetanus toxin: Localization in CNS and skeletal muscle using horseradish peroxidase labelled antitoxin.

Summary Rep. Third Int.Congr.Histochem.Cytochem., 303-304, Springer: New York (1968)

Mein besonderer Dank gilt Prof.H.H.Wellhöner,
dem Leiter der Abt. für Neuropharmakologie des
pharmakologischen Institutes, der mir freund-
licherweise das Thema dieser Arbeit überließ
und mit seiner Erfahrung zur Seite stand.

L e b e n s l a u f

- 1945 am 11.12. als Sohn des Zahnarztes Dr. med. dent.
W. Hensel geboren.
- 1965 Abitur am Gymnasium zu Otterndorf / Niederelbe.
Anschließend Beginn des Studiums der Medizin
zum Sommersemester an der Justus - Liebig -
Universität Giessen.
- 1967/68 Studium an der Universität Innsbruck zum
Wintersemester
- 1968 Rückkehr nach Giessen und Staatsexamen
- 1971 im Januar. Danach Beginn der Tätigkeit als
Medizinalassistent am Pharmakologischen
Institut der Justus - Liebig - Universität zur
Anfertigung einer Dissertation, wo nach ein-
jähriger Arbeit
- 1972 im März der experimentelle Teil dieser Arbeit
beendet wird. Danach Tätigkeit als Medizinal-
assistent an den Medizinischen Kliniken der
Justus - Liebig - Universität. In dieser Zeit
wird die vorliegende Dissertation abgeschlossen.
Anschließend bis heute Tätigkeit als Medizinal-
assistent an der Chirurgischen Abteilung des
Kreiskrankenhauses Schotten / Oberhessen.

FOTO-DRUCK LENZ · 63 Gießen · Riegelpfad 32/Ecke Ludwigstraße
Telefon 0641 - 77499